

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD
ANTIVIRAL DE *J. dioica* CONTRA EL VIRUS DE
HEPATITIS C (VHC) Y EL VIRUS DEL DENGUE (DENV-2).**

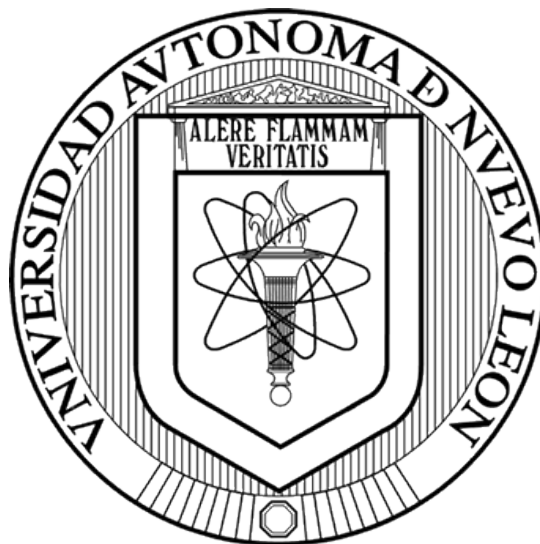
**POR:
JOSÉ GABRIEL LÓPEZ GUERRERO**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

MONTERREY, N. L. ENERO 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE *J. dioica*
CONTRA EL VIRUS DE HEPATITIS C (VHC) Y EL VIRUS DEL
DENGUE (DENV-2).

POR:

QFB JOSÉ GABRIEL LÓPEZ GUERRERO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

ASESOR:

DRA. C. ANA MARÍA G. RIVAS ESTILLA

MONTERREY, N. L.

ENERO 2021

Estudio *In vitro* de la actividad antiviral de *Jatropha dioica* contra el virus de hepatitis C (VHC) y el virus del Dengue (DENV-2).

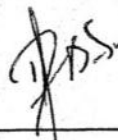
Aprobación de la tesis:



DR. C. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA
Director de tesis



DR. C. DAVID ARTURO SILVA MARES
Co-Director de tesis



DR. C. DANIEL ARELLANOS SOTO
Miembro de la comisión



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ
Subdirector de Estudios de Posgrado

COLABORACIONES

Dr. C. Kame Galán

M. C. Tanya Salas

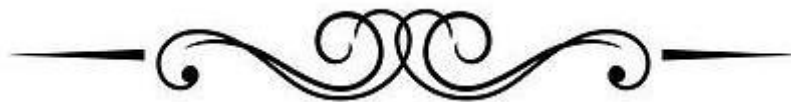
Dra. C. Sonia Lozano

M.C. Verónica Bravo

LAB. Infectología Molecular

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Facultad de Medicina, UANL



Para mis padres Carmen Guerrero y Julio López, quienes me han apoyado en este camino y dado un sin fin de consejos y han estado en cada una de las decisiones que he tomado. Los amo y les estoy eternamente agradecido por su amor incondicional. Son todo para mí.

Para mi hermana Anyuli y mi hermano Cesar por ser otros pilares en mi vida quienes también me han apoyado en esos momentos de tristeza y alegría, siendo cómplices en muchas de mis locuras y decisiones. Los amo.

Para mi esposa Elizabeth quien ha sido un motor en mi vida acompañadme en todo momento. Te amo

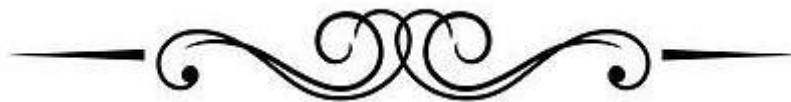
Para mis familiares quienes me han brindado su cariño y consejos continuos.

Para mis amigos y mi familia adoptiva en Monterrey.

Para ustedes.

Gracias





AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios, quien por el estamos en este bello camino llamado vida.

A mis padres, quienes apoyaron esta difícil decisión de cambiar de residencia para cumplir un sueño. No existen palabras para agradecerles cada una de sus palabras y consejos a lo largo de mi crecimiento personal y profesional.

A mis hermanos, quienes siempre estaba cuando los necesitaba, los amo y les estaré eternamente agradecido.

A mi esposa, quien siempre ha estado a mi lado en estos momentos de mi vida. Siempre te agradeceré tu confianza y tu apoyo incondicional.

Agradezco la oportunidad de formar parte de un excelente equipo de trabajo, “Infecto-team” muchas gracias por su compañía, consejos, amistad, tener la capacidad de soportarme por este tiempo, regañarme, orientarme, consolarme y levantarme cuando lo necesité: Sonia Lozano, Verónica Bravo, Tanya Salas, Kame Galán, Verónica Alvarado. Los aprecio y admiro a cada uno de ustedes,

A mis profesores del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular: Dr. Hugo Barrera, Dr. Jorge Ascacio, Dr. Augusto Rojas, Dra. Rocío Ortiz, Dr. Gerardo Padilla, Dr. Francisco Velázquez, Dra. Herminia Martínez, Dra. Viviana Zomosa, Dr. Carlos Córdova porque gracias a sus comentarios correcciones, cátedra y consejos que ayudaron a mi formación.

A todos los empleados del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, quien me ayudaron, fueron cómplices, orientaron e hicieron que el departamento se convertirá en un segundo hogar. Muchas gracias a cada uno de ustedes.

A el Dr. C. Daniel Arellanos, miembro de mi comisión de tesis, gracias por tu paciencia infinita, así como tu confianza y orientarme en todo momento, por tus correcciones, consejos y ser una guía en este camino. Eterna gratitud, respeto y admiración hacia ti.

A el Dr. C. David Silva, quien fue el codirector de esta tesis, gracias por su orientación y disponibilidad todo el tiempo que necesitaba de su orientación, su paciencia y confianza. Le estaré eternamente agradecido por cada una de sus palabras, no tengo como pagarle cada uno de sus consejos y tip's dentro de laboratorio.

Mi agradecimiento eterno para la Dra. C. Ana Rivas, usted creyó en mí y me dio la oportunidad llegar a las instalaciones a través del programa Delfín para realizar una estancia de verano, le estoy agradecido por contestar cada uno de los correos y prestarse para que pudiera realizar mi estancia bajo su tutela. A partir de ese momento la admire a usted y su grandioso grupo de trabajo que años después me permitió formar parte. Gracias por creer en mí y apostar por mí. Se ha convertido en una segunda madre, mi mentora y gracias por su apoyo, consejos, regaños, paciencia, mucha paciencia que me tuvo durante este viaje. Muchas gracias por compartir su experiencia y cariño conmigo, hizo sentirme en casa disfrutando cada momento. La quiero y la admiro mucho. Gracias.





TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

RESUMEN

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 HEPATITIS C	2
1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA	2
1.1.2. VÍAS DE TRANSMISIÓN	5
1.1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS	5
1.1.4. REPLICACIÓN DEL VHC	7
1.2. DENGUE	10
1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA	10
1.2.2. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN	14
1.2.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS	16
1.2.4. REPLICACIÓN DEL DENV	20
1.3. TRATAMIENTOS	22
1.4. LAS PLANTAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA	23
1.4.1. PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL	24
1.4.2. <i>Jatropha dioica</i>	26
Capítulo 2. ANTECEDENTES	28
2.1. ANTECEDENTES DIRECTOS	30
Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN	32
Capítulo 4. OBJETIVOS	33
4.1. OBJETIVO GENERAL	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
Capítulo 5. MATERIALES Y MÉTODOS	34

5.1.	LUGAR DE TRABAJO	34
5.4.	MATERIAL BIOLÓGICO	38
5.4.1.	LÍNEAS CELULARES.....	39
5.4.2.	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Jatropha dioica</i>	42
5.4.3.	VIRUS.....	42
5.5.	ESTRATEGIA GENERAL.....	42
5.5.1.	CULTIVO CELULAR.....	44
5.5.2.	GENERACIÓN DEL BANCO VIRAL DE DENV-2.....	44
5.5.3.	CONFIRMACIÓN MOLECULAR Y SEROTIPIFICACIÓN DE DENGUE.....	45
5.5.4.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CITOTÓXICA 50 (CC ₅₀) EN LAS LÍNEAS CELULARES.....	46
5.5.5.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN de ARN DEL VIRUS DE DENGUE PROTOTIPO 2.	47
5.5.6.	MODELO DE ESTUDIO CON VHC: MODELO DE REPLICÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN DE VIRUS DE HEPATITIS C.	47
5.5.7.	EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	48
5.5.8.	RETOTRANSCRIPCIÓN (RT-MMLV).....	49
5.5.9.	RT-qPCR PARA DENV-2.....	51
5.5.10.	qPCR PARA VHC	52
5.5.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	52
Capítulo 6.	RESULTADOS	53
6.1.	CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA <i>J. dioica</i> EN LÍNEAS CELULARES C6/36, VERO Y HUH-7 DETERMINANDO LA CC ₅₀	53
6.2.	AMPLIFICACIÓN Y EVALUACIÓN MOLECULAR DE PARTÍCULAS VIRALES.....	56
6.3.	EVALUACIÓN LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>J. dioica</i> CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE.....	57
6.4.	EVALUACIÓN LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>J. dioica</i> CONTRA EL VIRUS DE HEPATITIS C.	60
Capítulo 7.	DISCUSIÓN.....	64
Capítulo 8.	CONCLUSIONES.	68
Capítulo 9.	BIBLIOGRAFÍA.....	69
Capítulo 10.	ANEXOS	77

ABREVIATURAS

DENV-2	Virus de dengue serotipo 2
VHC	Virus de hepatitis C
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
cADN	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
H ₂ O	Agua
µg	Microgramos
mL	Mililitros
Pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa/ PCR en tiempo real
Ng	Nanogramos
PBS	Buffer fosfato salino
mM	Milimolar
GAPDH	Gliceraldehído-3.fosfato deshidrogenasa
DTT	Ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
CC ₅₀	Concentración citotóxica media
CI ₅₀	Concentracion inhibitoria 50
SSA	Secretaría de Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
ETV	Enfermedad transmitida por vector
Rpm	Revoluciones por minuto
V	Volts
SDS	Dodecil sulfato de sodio
nM	Nanometro
Hpt	Horas postratamiento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial del virus de hepatitis C (VHC)..	3
Figura 2. Tasa de incidencia de VHC acumulada del 2013-2018.	4
Figura 3. El virión del VHC.	6
Figura 4. Organización genética y el procesamiento de la poliproteína de VHC.	7
Figura 5. Unión e internalización de virus.	8
Figura 6. Distribución mundial del virus de dengue (DENV).	13
Figura 8 Dinámica de transmisión de DENV.	15
Figura 9. Incidencia y serotipo circulantes de DENV.	16
Figura 10. El virión de virus de dengue	17
Figura 11. Estructura del genoma del virus de dengue y las proteínas que codifican.	18
Figura 12. Funciones de las 10 proteínas codificadas por el virus de dengue.	19
Figura 13. Ciclo de replicación de DENV.	21
Figura 14. Microfotografía de una monocapa de células C6/36.	39
Figura 15. Microfotografía de una monocapa de células Vero.	40
Figura 16. Microfotografía de una monocapa de células Huh-7 parentales.	41
Figura 17. Microfotografía de una monocapa de células Huh-7 replicón.	41
Figura 18. Estrategia general	43
Figura 19. Citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> en células C6/36 evaluadas con azul alamar.	53
Figura 20. Citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> en células Vero evaluado con azul alamar.	54
Figura 21. Citotoxicidad en el rango de 400 a 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> en células Vero evaluado con azul alamar.	55
Figura 22. Citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> en células Huh-7 evaluado con azul alamar.	55
Figura 23. Evaluación molecular del virus de dengue por medio del protocolo de Lanciotti.	57
Figura 24. Ensayo de Actividad antiviral en células C6/36 con el Extracto hidroalcohólico.	58
Figura 25 Ensayo de Actividad antiviral en células Vero con el Extracto hidroalcohólico.	59
Figura 26. Determinación del número de veces que se expresa el ARN del virus de dengue.	60
Figura 27. Microfotografías 40x de células Huh-7 replicón subgenómico con ausencia y presencia de del extracto hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> .	61
Figura 28. Continuación (40x).	62
Figura 29. Determinación del número de veces que se expresa el ARN del virus de hepatitis C.	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de las proteínas codificadas por el virus de hepatitis c.	9
Tabla 2. Número de casos reportados de fiebre por dengue en las Américas.	12
Tabla 3. Incidencia en México de la infección por el virus del dengue.	14
Tabla 4. Tratamientos contra las infecciones por VHC y DENV, y los sitios de acción	22
Tabla 5. Fitoquímicos de las plantas medicinales como agentes contra el VHC.	29
Tabla 6. Condiciones de reacción para la detección molecular de DENV-2	45
Tabla 7. Programa de temperatura para la detección molecular del virus de dengue.	46
Tabla 8. Condiciones de reacción para la RT. Primera mezcla	49
Tabla 9. Condiciones de reacción para la RT. Segunda mezcla.	50
Tabla 10. Programa de reacción de retrotranscripción	50
Tabla 11. Condiciones de reacción para la RT-qPCR	51
Tabla 12. Reactivos para mezcla de RT-qPCR con Enzima SuperScript™ III	51
Tabla 13. Reactivos para mezcla de qPCR para VHC	52
Tabla 14. Valores de CC ₅₀ encontrados por línea celular	56

RESUMEN

Introducción: La infección por virus de hepatitis C (VHC) y el virus del dengue serotipo 2 (DENV-2), Están ampliamente distribuidas en el mundo y presentan una prevalencia elevada en países en vía de desarrollo, como en el caso de México.^{1, 2, 3} Entre los tratamientos actuales aprobados para la infección por VHC se incluyen el Telaprevir, Daclatasvir, Gazoprevir, entre otros; mientras que para dengue no existe tratamiento antiviral específico.^{4, 6, 7} Debido a lo anterior es importante continuar la búsqueda de nuevos agentes antivirales y el uso de plantas medicinales como fuente de metabolitos secundarios que presentan actividades biológicas, de esta manera aprovechar las ventajas terapéuticas que confieren las plantas medicinales.^{9, 10} En México, es muy amplio el conocimiento y manejo de plantas medicinales, teniendo un uso en toda la república con diferentes fines terapéuticos, como la actividad antiviral presentes en *Callisia fragans*, *Simmondsia chinensis* y *Jatropha dioica*.

Objetivo: Evaluar la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* contra el virus del Dengue (DENV-2) y el virus de Hepatitis C (VHC) *In vitro* en líneas celulares C6/36, Vero y Huh-7.

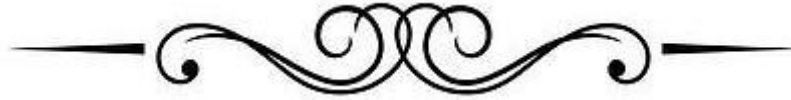
Materiales y Métodos: Se realizó un estudio *In Vitro* utilizando líneas celulares (C6/36, Vero y Huh-7) expuestos al extracto hidroalcohólico de *J. dioica* determinando la concentración citotóxica media (CC₅₀); Posteriormente se realizó la infección con el DENV-2, mientras que VHC se utilizó el modelo de estudio de Huh-7 replicón subgenómico. Las líneas celulares se expusieron a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* determinando la concentración en la que inhibe la expresión de ARN viral determinándose por q-PCR.

Resultados: Se obtuvo la CC₅₀ de las células C6/36, Vero y Huh.7 (60.6 µg/mL, 401.1 µg/mL y 460.1 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* respectivamente). También se determinó que en células Vero-infectadas con DENV-2 con una concentración de 10 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* inhibió un 80 % de la expresión de ARN viral; mientras que para VHC, en línea celular Huh-7 no se observó reducción en la expresión de ARN viral.



DRA. C. ANA MARIA GUADALUPE RIVAS ESTILLA

Firma del Director de tesis



Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.

El mundo actual, sumamente móvil, interdependiente e interconectado, ofrece innumerables oportunidades para la rápida diseminación de enfermedades infecciosas. Las enfermedades infecciosas se propagan ahora geográficamente con mucha mayor rapidez que en cualquier otro momento de la historia. Se calcula que en 2006 viajaron en avión 2100 millones de pasajeros; un brote o epidemia en cierto lugar del mundo puede convertirse en apenas unas horas en una amenaza inminente en cualquier otro punto del planeta.[1]

A partir de los años setenta, se han identificado a un ritmo sin precedente de una o más enfermedades nuevas por año. Hoy en día se conocen al menos 40 enfermedades que se desconocían una generación atrás. Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos como las bacterias, los virus, los parásitos o los hongos. Estos agentes infecciosos pueden transmitirse, directa o indirectamente, de una persona a otra. Además, en los últimos cinco años la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha verificado más de 1100 eventos epidémicos, de los cuales las infecciones causadas por los virus son de las más importantes y de mayor impacto a nivel mundial.[1, 2]

Los virus son parásitos intracelulares obligados, por lo tanto, necesitan invadir una célula para llevar a cabo su ciclo de replicación. Los virus se propagan y se transmiten de varias vías, como la vía oral, vía aérea, o por vectores. Por ejemplo, virus del Dengue (DENV), virus de Zika (ZIKV), Virus de Chikungunya (CHIKV), que se transmiten por mordedura de insecto. Algunos otros virus se transmiten por vía sexual y vía parenteral, por ejemplo, el virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el virus de Hepatitis C (VHC).[1]

1.1 HEPATITIS C

La hepatitis C es una enfermedad del hígado causada por la infección con el virus del mismo nombre (Virus de Hepatitis C); esta se puede presentar como una infección tanto aguda como crónica. Por lo general la infección aguda puede ser asintomática y raramente se asocia a una enfermedad potencialmente mortal (aproximadamente un 15-45 % de las personas infectadas), por razones que se desconocen, los pacientes infectados son capaces de delimitar la infección por los virus en los primeros 6 meses; mientras que el 85-55 % restante desarrollará infección crónica, donde un número considerable de estos pacientes con infección (15-30 %) desarrollarán cirrosis o cáncer de hígado y eventualmente conlleva a la muerte de los pacientes.[2]

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA

La Hepatitis C es prevalente en todo el mundo y aproximadamente existen 71 millones de personas con infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), y se estimó que 1,75 millones de nuevas infecciones por VHC ocurrió en todo el mundo en 2015. [2] La OMS estimó que en 2016 murieron unas 399 000 personas debido a la hepatitis C. Las regiones de la OMS más afectadas son las del Mediterráneo Oriental y Europa, con 15 millones y 14 millones de personas infectadas respectivamente, en el 2015. [2], así como África y América, se estimó 10 millones y 7 millones de personas con infección por VHC. como se muestra en la figura 1. [2]

En el continente americano, se estima que 7,2 millones de personas viven con hepatitis C crónica en la región, de las cuales sólo un 25% ha recibido un diagnóstico y de ellas unas 300.000 reciben tratamiento. Gracias a los nuevos tratamientos disponibles, cerca del 90% de las personas infectadas con hepatitis C pueden curarse, y reducir el riesgo de muerte por cáncer de hígado o cirrosis. [3, 4]

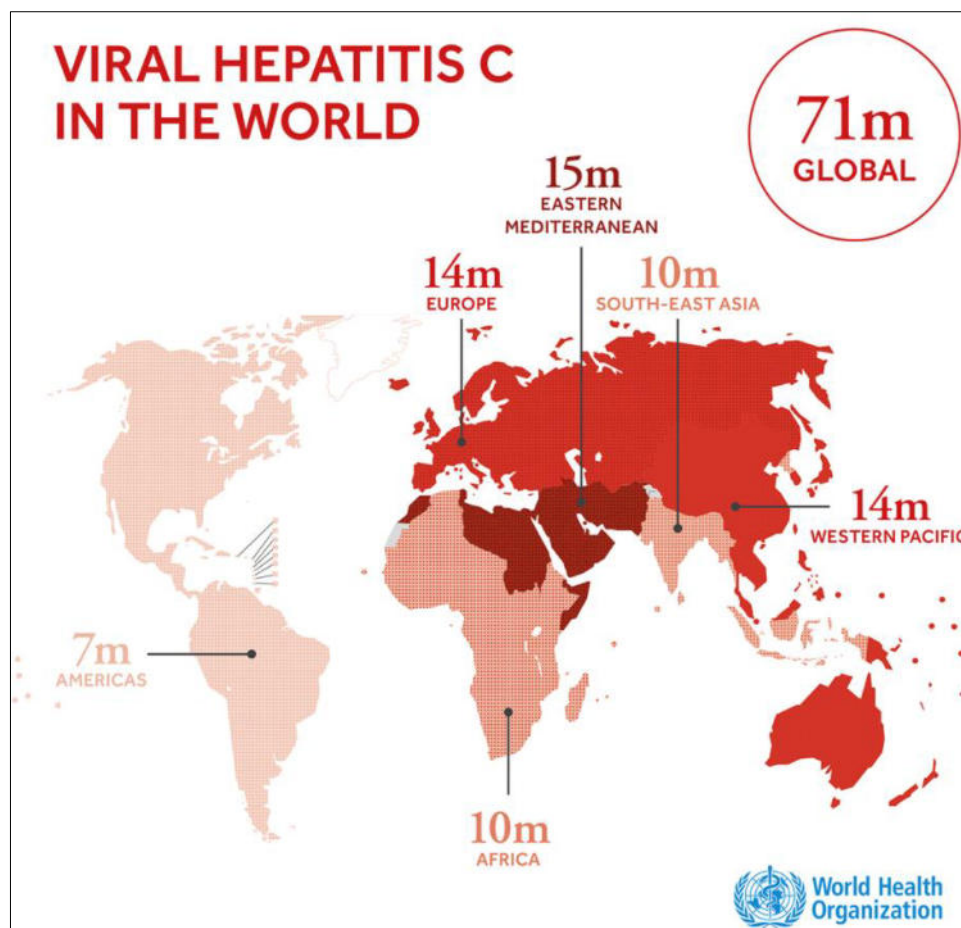


Figura 1. Distribución mundial del virus de hepatitis C (VHC). Datos obtenidos en [who-global-hepatitis-infographicf70d20c888d34aa48f7fe4c166086ba9.gif](https://www.who.int/infographic/hepatitis-c) (1200×1200) página visitada en enero 2021.

En México, se estima que 4 de cada 1,000 personas viven con el virus de la Hepatitis C. [5] La Encuesta Nacional de Salud (ENSA) elaborada en el año 2000 reportó una prevalencia de hepatitis C de 1.4%, siendo mayor en hombres (1.4%) que en mujeres (1.3%), sobre todo en personas mayores de 60 años. [6] Por otro lado la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2012 reportó una prevalencia del 0.7%, nuevamente superior en hombres (0.24%) que en mujeres (0.09%). [7] De manera adicional, el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea reporta una prevalencia en donadores de 0.5%. Considerando estos datos, México ocupa el segundo lugar en América Latina, después de Brasil, con el mayor número de casos de Hepatitis C. [5]

En diciembre del 2020, se identificó la distribución de la incidencia acumulada del 2013 al 2018 por VHC en los municipios de cada estado, observado en la figura 2. Los diez municipios con mayores tasas de incidencia registradas de VHC por cada 100 mil habitantes fueron: Ensenada (tasa de 15.7), Tijuana (tasa de 13.8), Mexicali (tasa de 11.2), Ixmatlahuacan (tasa de 10.3), Amatitlán (tasa de 8.8), Cuauhtémoc (tasa de 6.6), Acula (tasa de 6.0), Playas de Rosarito (tasa de 5.8), Tecate (tasa de 5.7) y Puerto Peñasco (tasa de 5.1). Estas se encuentran en las entidades federativas: Baja California, Veracruz, CDMX y Sonora. [8]

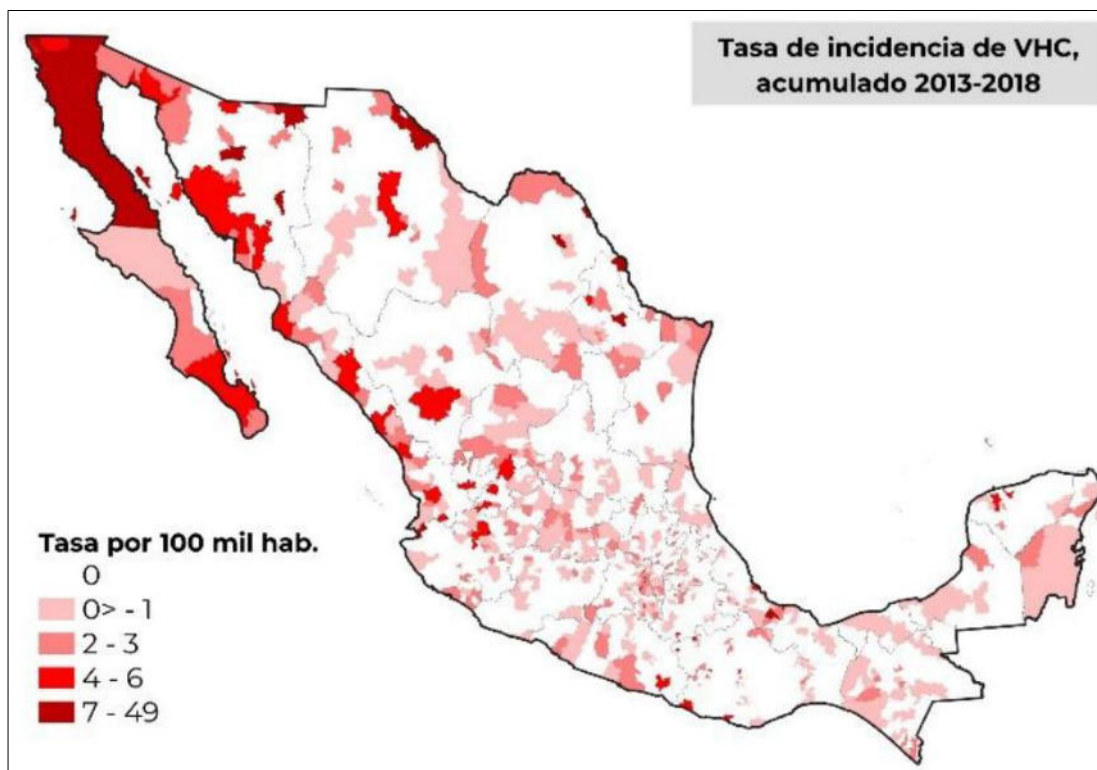


Figura 2. Tasa de incidencia de VHC acumulada del 2013-2018. Reportando una tasa de incidencia más elevada en los municipios de las entidades federativas: Baja California, Veracruz, CDMX y Sonora. Datos obtenidos en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/603406/Boletín_VHC-Vol_3.pdf.

1.1.2. VÍAS DE TRANSMISIÓN

El virus de la hepatitis C (VHC) se transmite principalmente por vía parenteral, aunque también se puede por vías no parenterales. [3, 5, 9] El virus de la hepatitis C se transmite principalmente por vía parenteral, por la exposición percutánea o de mucosas a sangre y hemoderivados infectados con el virus. La transmisión se puede producir por el consumo de drogas inyectables, mediante el uso compartido de agujas y otros materiales de inyección, transfusiones, uso de hemoderivados y trasplantes de órganos de donantes infectados; estos últimos, actualmente existe un riguroso control serológico previo de los donantes. [8] La reutilización o esterilización inadecuada del equipo médico, especialmente jeringuillas y agujas. La transmisión nosocomial representa entre el 15-25%, accidentes biológicos, especialmente por pinchazos con agujas utilizadas en pacientes infectados y tatuajes y piercings. [3, 5, 9]

En la infección por el virus de la hepatitis C, no existe evidencia que esta se pueda adquirir o transmitirse a través de la leche materna, los alimentos o el agua, ni por contacto ocasional, por ejemplo, abrazos, besos, compartir comidas o bebidas con una persona infectada.[8, 9]

1.1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS

Según la clasificación de Baltimore, el VHC pertenece al género *Hepacivirus*, de la familia *Flaviviridae*. Por analogía con otros miembros de la familia *Flaviviridae*, se cree que el VHC podría adoptar una estructura icosaédrica, sin embargo, datos recientes sugieren que el VHC tiene una estructura pleomórfica, con las glucoproteínas E1 y E2 incrustadas en la membrana lipídica derivada del retículo endoplasmático de la célula huésped. [10, 11]

El VHC es un virus envuelto que mide aproximadamente 50 nM y presenta una cápside proteica, posee un genoma de ARN de cadena sencilla con polaridad positiva (ARN(+)) con un tamaño aproximado de 9.6 Kb, esquematizado en la figura 3.[5,9,11, 12]

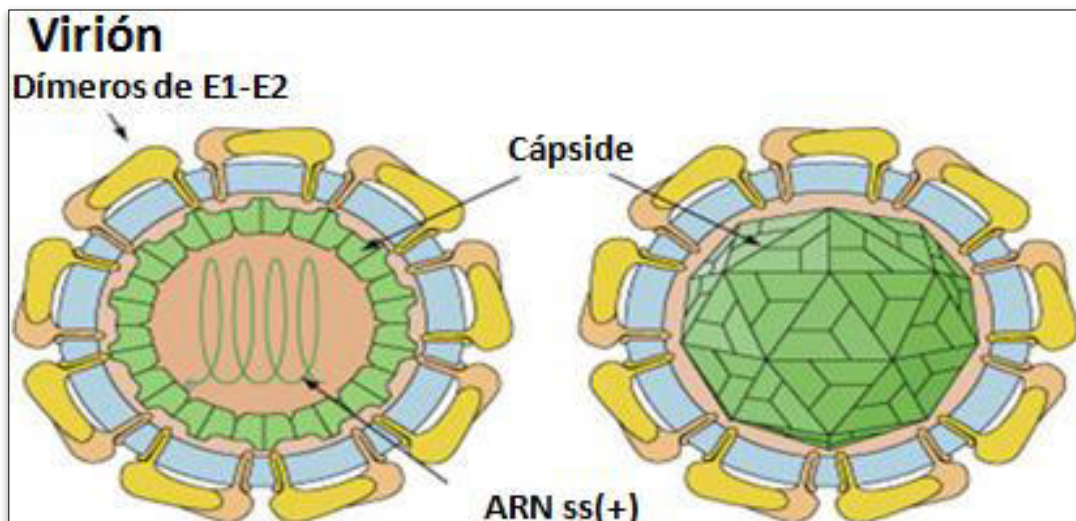


Figura 3. El virión del VHC. Se observa la partícula viral envuelta, de aproximadamente 50 nM de diámetro, con un genoma de ARN de cadena sencilla, con aproximadamente 9.6 kb de polaridad positiva (+). (ExpASy, 2017)

El genoma del VHC consta de un único marco de lectura de entre 9.024 y 9.111 pb, dependiendo del genotipo. El marco de lectura está flanqueado por 2 regiones no codificantes (RNC) en los extremos 5' y 3', Como se observa en la figura 4. [11, 13]

La traducción del marco de lectura da lugar a una poliproteína precursora de unos 3.000 aminoácidos aproximadamente. Esta poliproteína es procesada tanto por proteasas del huésped y virales dando lugar a 3 proteínas estructurales y 6 proteínas no estructurales. (figura 4) [11, 13,14]

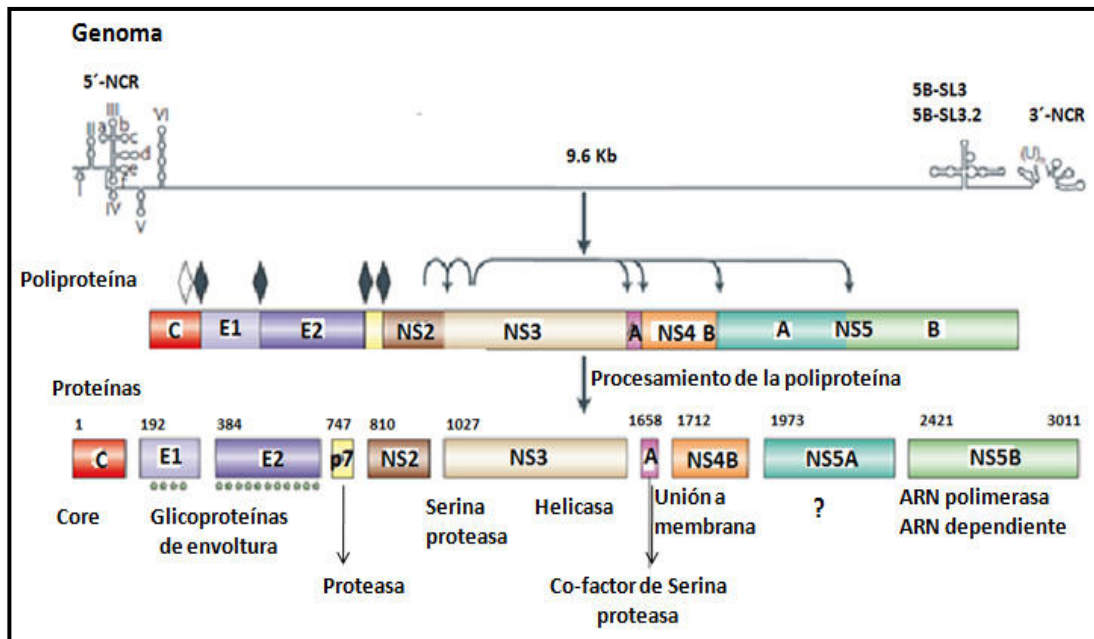


Figura 4. Organización genética y el procesamiento de la poliproteína de VHC. Se observa la cadena con polaridad positiva de ARN, donde se observan esquematizados los extremos 5' y 3' de las regiones no codificantes y el gen que dará origen a la poliproteína. Se observa el elemento activo en cis de replicación (5B-SL3), también el sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). De la poliproteína se observa los puntos de incisión por una peptidasa representada por un rombo, obteniendo así las 3 proteínas estructurales (Core, E1 y E2), mientras que las flechas indican los sitios de actividad de la proteasa generando las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4, el Cofactor de la Serina proteasa, NS4B, NS5A, NS5B). (Darius Moradpour, 2007)

1.1.4. REPLICACIÓN DEL VHC

Las proteínas estructurales, que forman a la partícula viral, incluyen la proteína Core y las glicoproteínas de envoltura, E1 y E2. Mientras que las proteínas no estructurales son NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B, incluyendo a la proteína p7; las cuales cumplen diversas funciones durante el ciclo de replicación (Tabla 1). [11, 13, 14]

El VHC se replica en los hepatocitos siendo estas sus células blanco, aunque también se ha reportado que pueden infectar a linfocitos B, células dendríticas y otros tipos celulares. La replicación del VHC, se lleva a cabo en los siguientes pasos; primer paso, la unión e internalización de virus, segundo

paso, liberación citoplasmática, tercer paso, traducción y procesamiento de poliproteínas, cuarto paso, la replicación de ARN, embalaje y montaje, y el sexto paso, la maduración y liberación de los viriones, como se muestra en la figura 5. [13, 14]

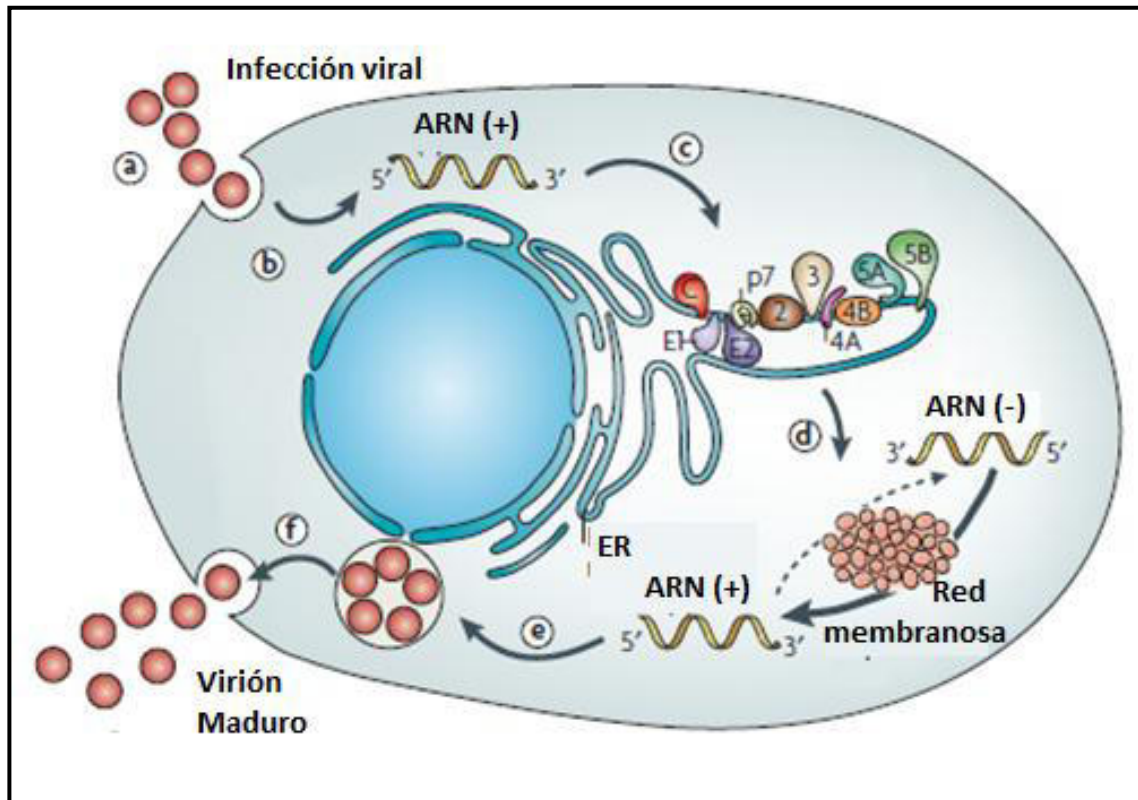


Figura 5. Unión e internalización de virus (a); Liberación citoplasmática y no recubrimiento (b); Traducción y procesamiento de poliproteínas (c); Replicación de ARN (d); Embalaje y montaje (e); Virión maduración y liberación (f). La topología de las proteínas estructurales y no estructurales del VHC en la membrana del retículo endoplásmico se muestra esquemáticamente. La replicación del ARN del VHC ocurre en una alteración específica de la membrana. Obsérvese que la traducción mediada por IRES y el procesamiento de poliproteínas, así como la formación de la membrana y la replicación de ARN, que se ilustran aquí como pasos separados para simplificar, podrían ocurrir de una manera estrechamente acoplada. IRES, sitio interno de la entrada del ribosoma.

Proteína	Función	Refs.
Core (C)	Entrada y ensamblaje de nuevos viriones.	11, 12, 13
Envoltura (E1 y E2)	Entrada y ensamblaje de nuevos viriones.	11, 12, 13
proteína p7	Maduración y liberación de las partículas virales.	11, 13, 17
NS2	NS2/p7/E2 tiene un papel crucial en la producción de viriones y proteasa dependiente de zinc.	13, 17
NS3	Serina proteasa, es un catalizador del procesamiento del resto de las proteínas no estructurales en los sitios.	11, 13, 14
NS4A	Es cofactor de la proteasa NS3.	13, 14, 16
NS4B	Altera las membranas intracelulares y formar una red de membranas tipo “andamio” esencial para la formación del complejo de replicación.	14, 15, 16
NS5A	Metaloproteasa dependiente de zinc, modula la eficacia de la replicación.	11, 16, 18
NS5B	ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp)	11, 14, 16

Tabla 1. Funciones de las proteínas codificadas por el virus de hepatitis c.

1.2. DENGUE

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos a humanos más frecuente en el mundo, esta arbovirosis se transmite por picadura de mosquitos hembra principalmente de la especie *Aedes aegypti*, y *Aedes albopictus*. [19]

Los países tropicales y subtropicales son los más afectados por esta arbovirosis, y se contempla que cerca de la mitad de la población mundial se encuentra en riesgo de infectarse en algún momento de su vida. [19, 20] Sus manifestaciones clínicas varían de acuerdo con la severidad en la que se presente, clasificándose como dengue clásico, cuando es un síndrome febril autolimitado; y dengue, este fue identificado por primera vez en los años 50's del siglo pasado durante la epidemia en Filipinas y Tailandia. En la actualidad, afecta mayor parte de países de Asia y América Latina, convirtiéndose en la primera causa de hospitalización y muerte en los niños y adultos de dichas regiones. [20, 21]

1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA

En los últimos años, ha aumentado la incidencia de dengue en el mundo. El número real de casos de dengue está subdiagnosticado y muchos casos son mal diagnosticados. Según una estimación obtenida por modelización en 2020, se producen 390 millones de infecciones por dengue cada año de los cuales 96 millones (20 %) se manifiestan clínicamente y el 80 % cursan de forma asintomática. La OMS estima que 129 países, están en riesgo de infección por los virus del dengue. [19, 20]

Antes de 1970, solo nueve países habían sufrido epidemias de dengue grave. Sin embargo, en la actualidad, esta arbovirosis es endémica en más de 100 países de las regiones de África, América, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. Siendo estas últimas las más afectadas, y

en 2008 registraron en conjunto más de 1.2 millones de casos, y en 2015, más de 3.2 millones. (Figura 6) [20, 21, 22]

En 2017, se notificó una reducción considerable en el número de casos de dengue en las Américas: de 2 177 171 casos en 2016 a 584 263 casos en 2017. Ello representa una reducción del 73%. Los únicos países en los que se registró un aumento de los casos en 2017 fueron Aruba, Panamá y el Perú. [22, 23]

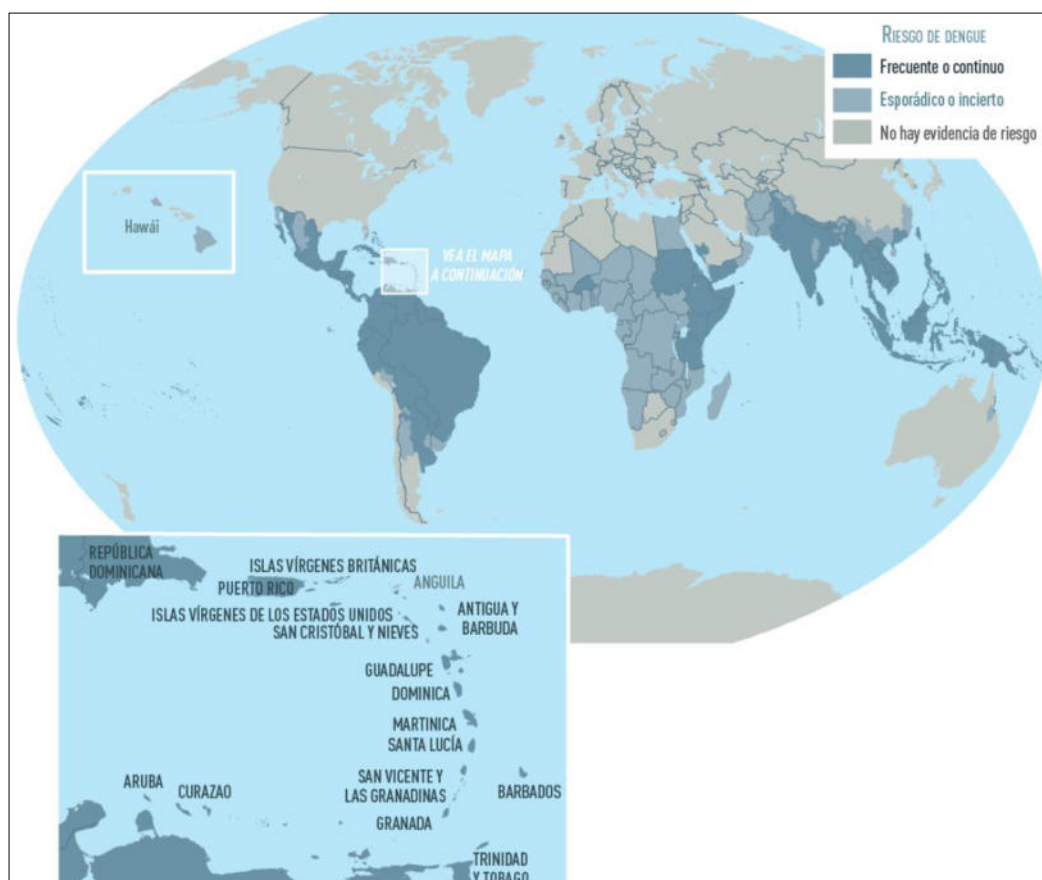


Figura 6. Distribución mundial del virus de dengue (DENV). Se observa países tropicales y subtropicales en la cual existe una alta incidencia de infecciones por el virus del dengue, se observa que América Latina presenta una alta incidencia, incluyendo a México, Brasil quien, junto a la India, y a países asiáticos presentan las tasas más altas de esta arbovirosis. Datos disponibles en: <https://www.cdc.gov/dengue/es/areaswithrisk/around-the-world.html> pagina visitada en enero 2021.

En 2020, el dengue sigue afectando a varios países, y se han notificado aumentos en el número de casos en Bangladesh, Brasil, Ecuador, India,

Indonesia, Islas Cook, Maldivas, Mauritania, Mayotte (Francia), Nepal, Singapur, Sri Lanka, Sudán, Tailandia, Timor-Leste y Yemen. [23, 24, 25] En el continente americano, los países más afectados por esta infección son Brasil, Paraguay y México (Tabla 2). [26]

País	No. De Casos 2020
Brasil	1,418,296
Paraguay	223,262
México	120,639
Bolivia	84,688
Colombia	78,298

Tabla 2. Número de casos reportados de fiebre por dengue en las Américas. Destacando a México quien ocupa el tercer lugar en el número de casos reportados de fiebre por dengue. Datos disponibles en: <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html>.

En México, durante el 2020, se reportaron un total de 119,639 casos reportador de fiebre por dengue, obteniendo una incidencia de 105.60 por cada 100 mil habitantes. (Figura 7) [26] Los 3 estados con mayor tasa de incidencia son: Nayarit (tasa de 509.50), Tamaulipas (tasa de 421.19), Jalisco (tasa de 272.94), Nuevo León ocupa el noveno lugar con una tasa de incidencia de 133.74, mientras que Chiapas ocupa el lugar número 20 con una tasa de 33.98. [26]

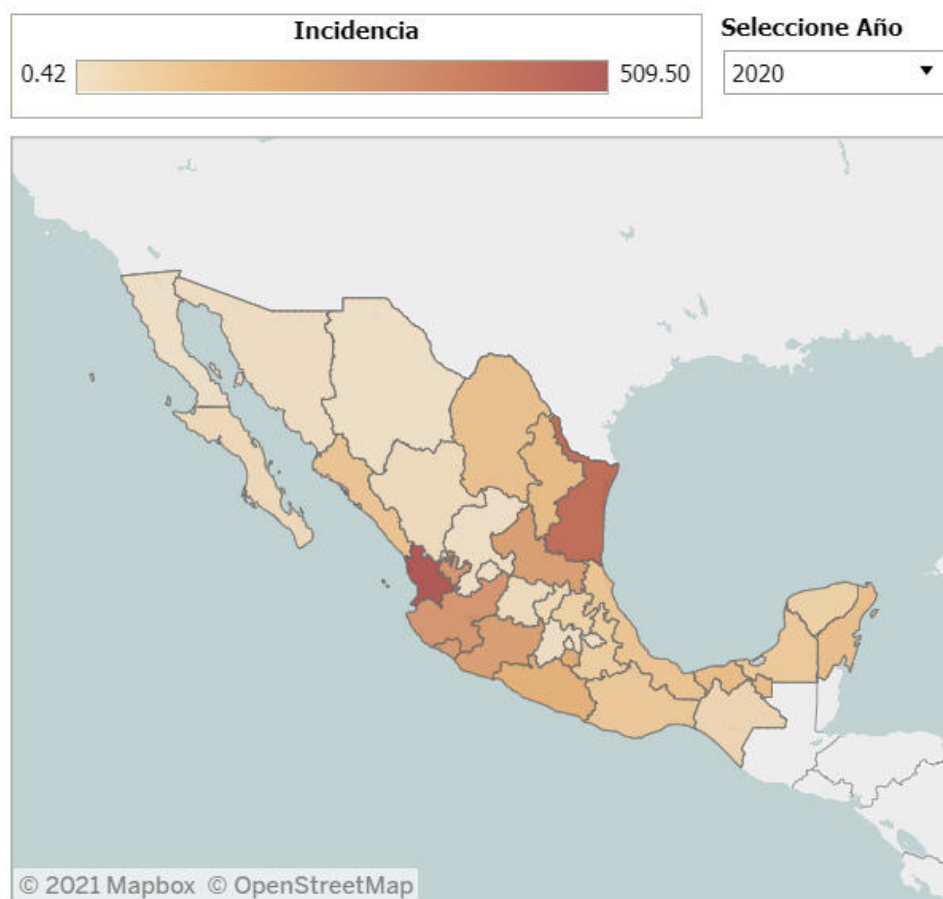


Figura 7 Tasa de incidencia en México en el año 2020. La tasa nacional es de 105.60 por cada 100 mil habitantes. Los estados con mayor tasa de incidencia son: Nayarit (tasa de 509.50), Tamaulipas (tasa de 421.19), Jalisco (tasa de 272.94). Datos disponibles en: <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-subnacional/519-mex-egi-incidencia-es.html>.

En México, las arbovirosis y las enfermedades transmitidas por vectores (ETV), representan un importante problema de salud pública, En el 2020 se estimó que cerca del 60 % del territorio nacional presenta condiciones que favorecen la transmisión de las ETV, teniendo un aproximado de 50 millones de personas que están en contacto con el vector donde la mayor son en centros agrícolas, ganaderos, industriales, pesqueros, petroleros y turísticos. [27]

En México, la incidencia en la semana epidemiológica 52 del 2020 es de 19.06 por cada 100 mil habitantes, según la Dirección General de

Epidemiología, teniendo por entidad federativa una incidencia por dengue de: en San Luis Potosí (65.74), Jalisco (64.03), Nayarit (62.75), Tamaulipas (60.71), Michoacán (53.00), Colima (49.69), Nuevo León (41.84), Coahuila (31.09), Morelos (30.78), Hidalgo (25.19), Sinaloa (23.41), Veracruz (18.31), Querétaro (17.37), Guerrero (16.65), Tabasco (15.85), Puebla (15.00), Quintana Roo (12.68), Durango (6.87), Yucatán (6.53), Oaxaca (6.52), Chiapas (5.76), Guanajuato (5.35), Campeche (4.10), Baja California Sur (3.30), Zacatecas (1.16) Sonora (0.26) y Aguascalientes, Baja California, Chihuahua, Cd. México y Tlaxcala con una incidencia de 0 (Tabla 3). [27]

Estado	Dengue	
	Confirmados	estimados
1.- San Luis Potosí	1,886	65.74
2.- Jalisco	5,355	64.03
3.- Nayarit	837	62.75
7.- Nuevo León	2,276	41.84
21.- Chiapas	321	5.76
México	24,224	19.06

Tabla 3. Incidencia en México de la infección por el virus del dengue. Se muestra el número de casos confirmados de dengue por entidad federativa, resaltando la incidencia de México donde existen hasta la semana epidemiológica no.52 del 2020, un número de casos confirmados de 24,224 teniendo una incidencia de 19.06 por cada 100 mil habitantes. (Dirección general de Epidemiología, DGA InDRE, semana epidemiológica No.52, 2020).

1.2.2. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

El principal mecanismo de transmisión de esta arbovirosis es a través de la picadura de mosquitos hembra de la especie *A. aegypti* y en menor proporción *A. albopictus*, adaptándose al ámbito humano, con criaderos, fuente de alimentación y desplazamiento activo y pasivo ligados al entorno domiciliario, proliferando en recipientes artificiales donde exista acumulaciones de agua, como en basureros, patios, jardines y en cualquier recipiente de desecho por los humanos. [23, 25] Por lo cual constituye uno de los principales desafíos para el control y la vigilancia epidemiológica, siendo el principal reto, el hacer más eficiente las acciones para prevenir la aparición de brotes y en su caso,

atenderlos de forma oportuna evitando su propagación. [25] Los mosquitos adquieren el virus cuando se alimentan de un humano virémico, y de esta manera pueden transmitir el virus a otro humano después de 8 a 12 días de la ingesta inicial (Figura 8). [25, 28]

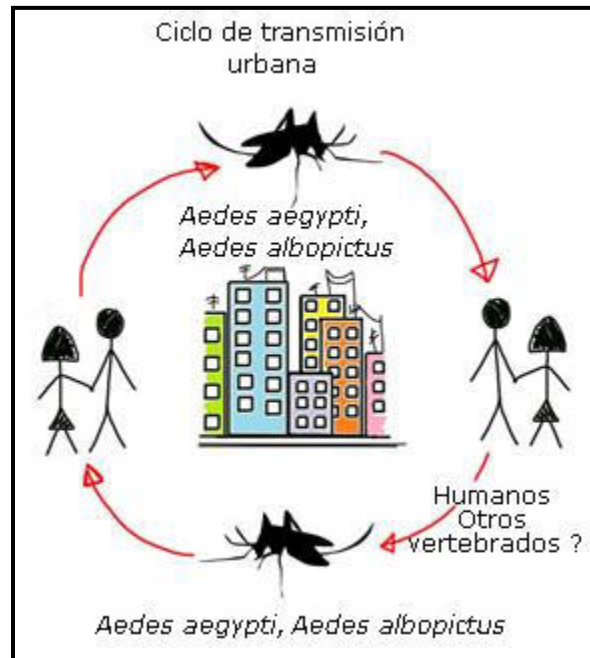


Figura 8 Dinámica de transmisión del virus del dengue. Se sabe que el género *Aedes* es el vector principal de esta arbovirosis, siendo los mosquitos hembra de las especies *A. aegypti* y *A. albopictus* los responsables del ciclo urbano de transmisión del virus del dengue a los humanos. (OMS, 2016)

Aunque también existen reportes de transmisión directa del virus de persona a persona, por donación y trasplante de órganos y medula ósea, así como el uso de punzocortantes infectadas; y existe el riesgo latente de transmisión viral por medio de transfusión por pacientes que cursen por una enfermedad asintomática (el 80% de los pacientes infectados por dengue, cursan por una enfermedad asintomática). [23, 25]

1.2.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS

El agente etiológico de la enfermedad por dengue es un virus miembro de la familia *Flaviviridae*, del género *Flavivirus* llamado virus del dengue (DENV). [23-30] El DENV fue el segundo patógeno viral identificado (después del virus de la fiebre amarilla) en el año 1907 por Asburn y Craig, y fue aislado hasta 1943, y se identificaron 4 serotipos diferentes de DENV llamadas DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4. [23, 25, 27] En México, circulan los 4 serotipos de DENV. [27] En estados como Nuevo León, Veracruz y tabasco circulan los 4 serotipos de DENV, es la mayoría de los estados circulan los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-3 (Figura 9). [27]

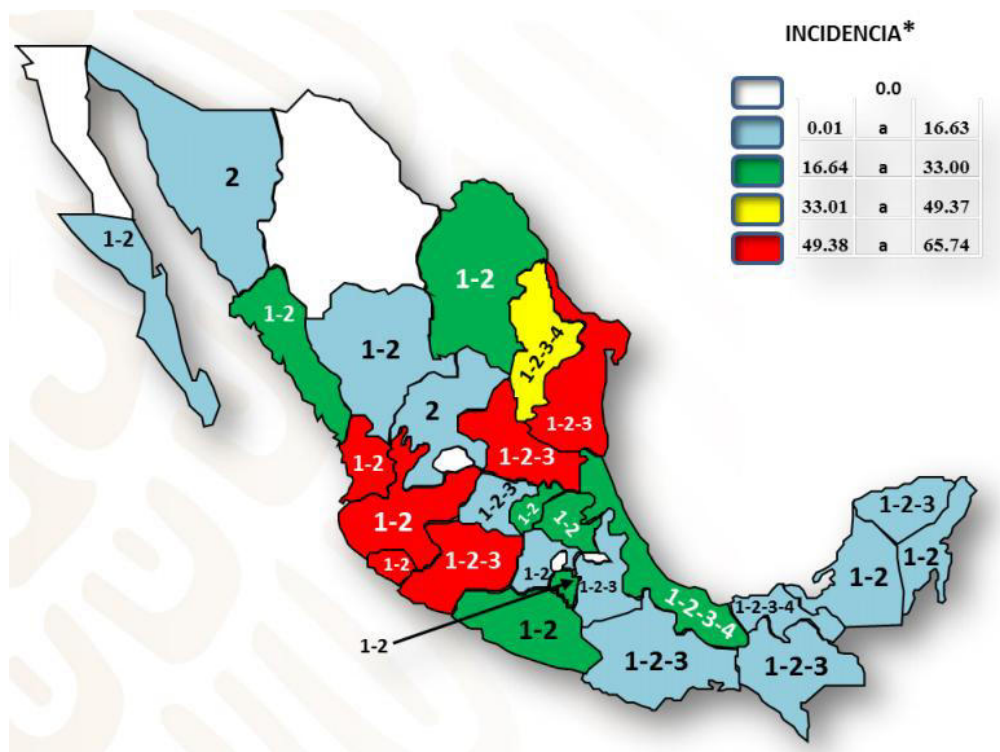


Figura 9. Incidencia y serotipo circulantes del virus de dengue. En México, circulan los 4 serotipos del virus de dengue, aunque por entidad federativa circulan diferentes serotipos, los serotipos virales que circulan en Nuevo León son 1, 2, 3 y 4 (DGA InDRE, semana epidemiológica No.52, 2020)

La partícula viral contiene un genoma de ARN de polaridad positiva, presentando una cápside con simetría icosaédrica, con una envoltura externa la cual presenta proteínas prM y E (Figura 10). [24, 28]

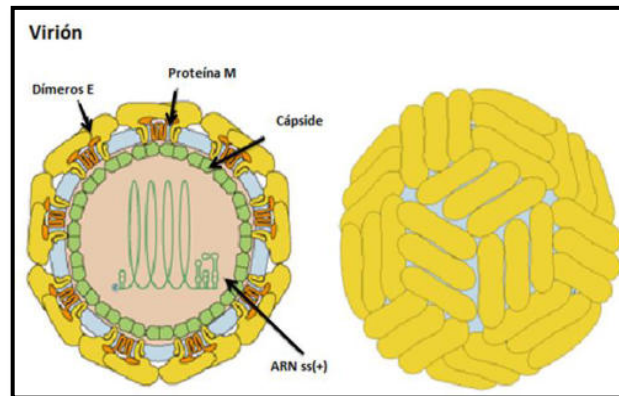


Figura 10. Se observa la partícula viral envuelta, de aproximadamente 50 nM de diámetro, envoltura con un sentido positivo de una sola cadena de RNA de polaridad positiva (+) (Zhang, 2014, Expasy, 2016)

El genoma del DENV es de aproximadamente 11 Kb, el cual presenta un marco de lectura abierto (ORF, del ingles *Open Reading frame*), el cual presenta dos regiones no traducibles en sus extremos 5' y 3'; la cual proporcionan estabilidad y son sitios de regulación. [29-31]

El ORF codifica para una única poliproteína, la cual sufre diversos procesos de cortes por la proteasa viral, así como por proteasas de la célula huésped, de esta manera genera proteínas virales individuales. Las cuales son tres proteínas estructurales: *Core* (C), membrana (prM) y envoltura (E); así como siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), (figura 11). [29-31] Las cuales presentan diversas funciones durante el ciclo de replicación viral (tabla 4). [31]

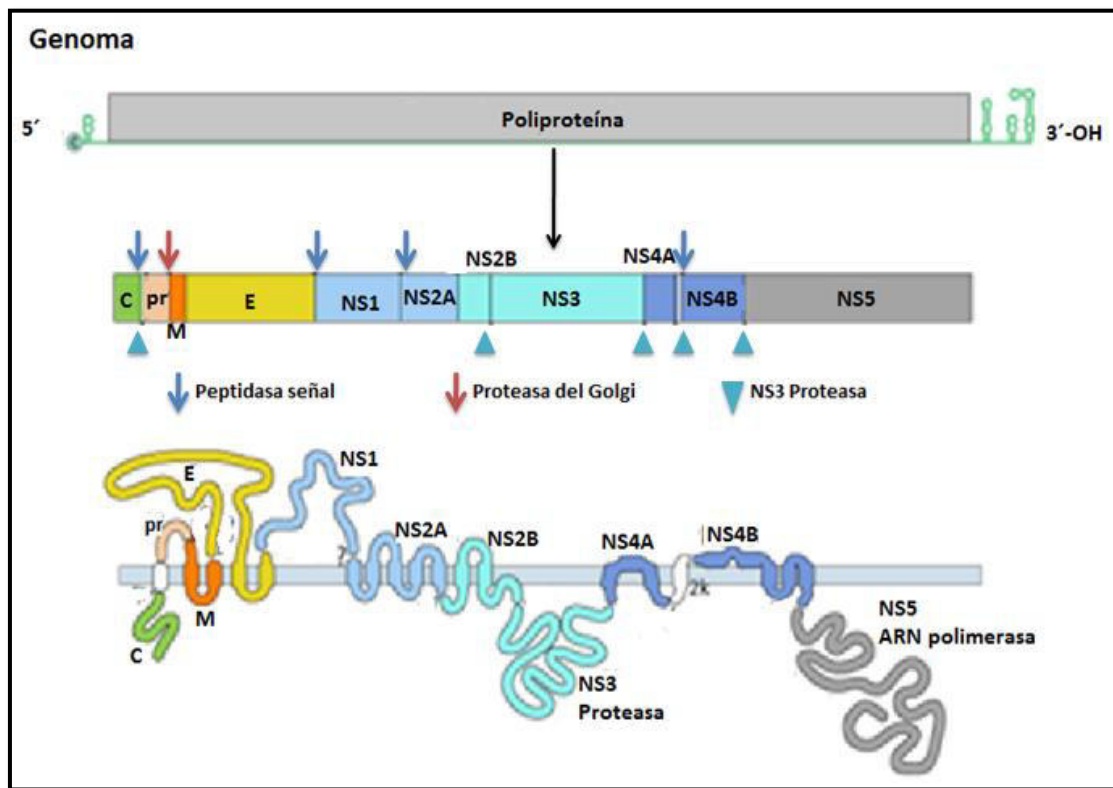


Figura 11. Estructura del genoma del virus de dengue y las proteínas que codifican. El genoma del DENV es de aproximadamente 11 Kb que codifican un marco de lectura abierto para tres proteínas estructurales, core (C), la membrana (M) y la envoltura (E), y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), observando que en el extremo 5' del genoma presenta un capuchón, mientras que en el extremo 3' no está poliadenilado sino que forma una estructura de bucle. (Zhang, 2014, Expasy, 2016)

Proteína	Función	Refs.
Core (C)	Entrada y ensamblaje de nuevos viriones.	29-31
Proteína asociada a membrana (prM)	Entrada y ensamblaje de nuevos viriones.	29-31
Envoltura (E)	Entrada y ensamblaje de nuevos viriones.	29-31
NS1	Relacionada con la replicación del RNA viral, puede encontrarse en balsas lipídicas en la superficie celular. Actividad de transducción de señales	29-34
NS2A	Relacionada con la unión del complejo de replicación viral al retículo endoplásmico y en la coordinación del empaquetamiento y replicación del ARN.	29-33
NS2B	Es cofactor de la serin proteasa NS3.	29-31
NS3	Serin proteasa viral con actividad de trifosfatasa y ARN helicasa.	29-33
NS4A	Participa en el anclaje del complejo de replicación viral al retículo endoplásmico.	29-33
NS4B	Participa en el anclaje del complejo de replicación viral al retículo endoplásmico y en la inhibición de IFN.	29-33
NS5	Metiltransferasa. ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp)	29-33

Figura 12. Funciones de las 10 proteínas codificadas por el virus de dengue.

1.2.4. REPLICACIÓN DEL DENV

La replicación del DENV, se lleva a cabo en el citoplasma de la célula huésped, donde las partículas virales utilizan la maquinaria celular para generar nuevas partículas infectivas, [28, 30, 31]. Los viriones se adhieren a la superficie de una célula huésped y posteriormente entran en la célula mediante endocitosis mediada por receptor. Se han identificado varios receptores primarios y correceptores de baja afinidad para flavivirus (como DC-SING, GRP79 y CD14; y como correceptores, la heparina y otros glucosaminoglicanos). [30, 31]

La acidificación de las vesículas endosómicas provoca cambios conformacionales en el virión, fusión de las membranas víricas y con ello, el desensamble del virus, y así, liberar en el citoplasma, el ARN de sentido positivo se traduce en una única poliproteína que se procesa co- y postraduccionally por proteasas virales y de las células huésped. La replicación del genoma ocurre en las membranas del retículo endoplásmico. [30-34]

El ensamblaje del virus ocurre en la superficie del retículo endoplásmico cuando las proteínas estructurales y los brotes recién sintetizados del ARN en el lumen del retículo endoplásmico. Las partículas virales y subvirales inmaduras no infecciosas resultantes son transportadas a través de la red trans-Golgi. Las partículas de virión inmaduro se escinden por la proteasa de furina, dando como resultado partículas maduras e infecciosas. Los viriones maduros y las partículas subvirales son posteriormente liberados por exocitosis (figura 12). [30-34]

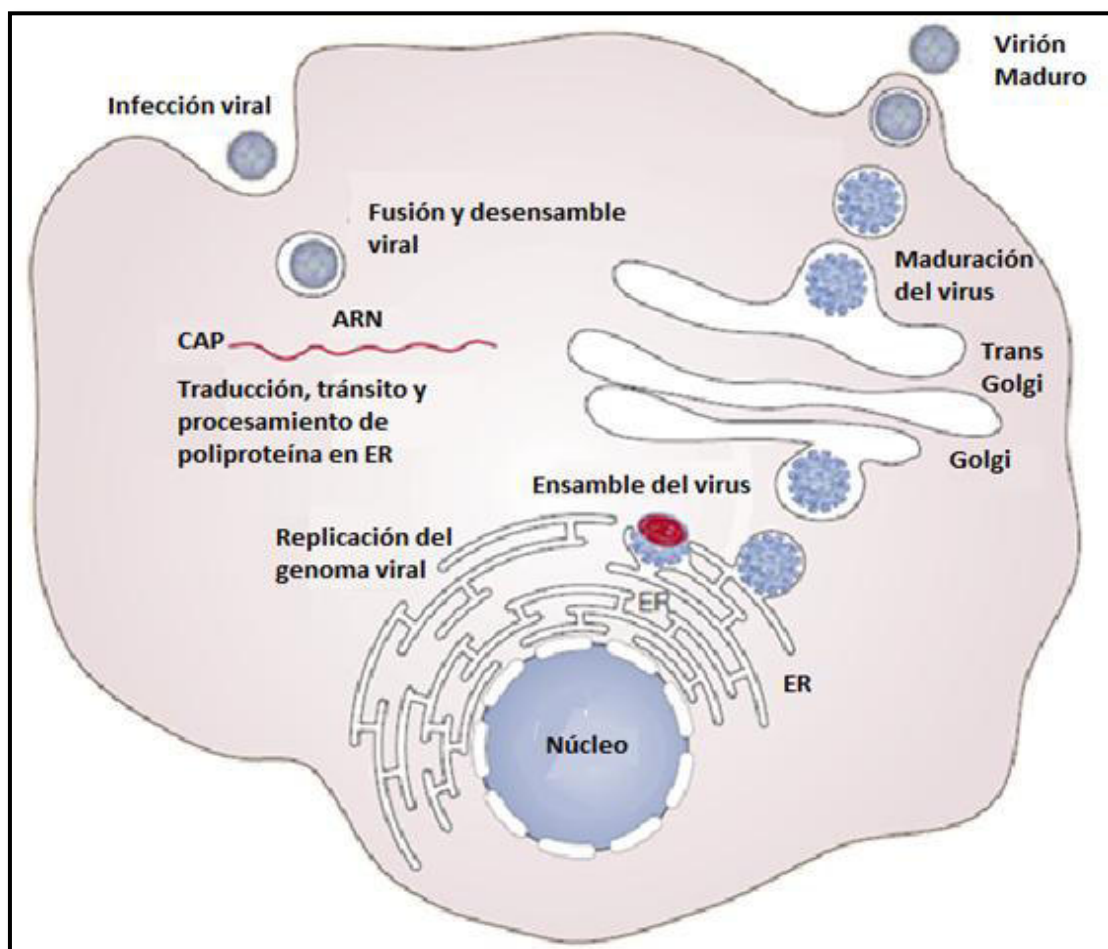


Figura 13. Ciclo de replicación del virus del dengue (DENV). El ciclo de replicación del DENV, consta por el reconocimiento y entrada a la célula blanco, fusión del endosoma con la membrana viral, y con ello, se libera el material genético del virus, después sigue la traducción del ARN viral y la replicación del ARN, el ensamblaje ocurre en el lumen de ER, y se dirige al Golgi para la maduración de las partículas virales y es la red trans-Golgi donde se genera la exocitosis por la cual el virus es liberado. (Mukhopadhyay, 2005, Miller Sven, 2008).

1.3. TRATAMIENTOS

La terapia contra el VHC está integrada por fármacos de acción directa que pueden curar a más del 90% de las personas con infección por el VHC y que son eficaces contra genotipos que anteriormente eran difíciles de tratar. Entre los tratamientos actuales aprobados para la infección por VHC la ribavirina (RBV), varios inhibidores de la proteasa (boceprevir, telaprevir y simeprevir) y el inhibidor nucleotídico de la polimerasa NS5B (sofosbuvir). [2, 4, 9]

Mientras que para el virus de dengue no hay agentes antivirales específicos. El dengue grave es una complicación potencialmente mortal, pero su diagnóstico clínico precoz y una atención clínica cuidadosa por personal médico y de enfermería experimentada suele reflejarse en una recuperación exitosa de los pacientes. [19, 23, 38]

VIRUS	DENV	VHC
TRATAMIENTO	N/A	Ribavirina, Telaprevir, simeprevir, Declastasvir, Grazoprevir, Gasoprevir, Sofosbuvir
SITIO DE ACCIÓN	N7A	Inhibidores de la síntesis del ADN. Inhibidores de la proteasa; Inhibidores de NS5B

Tabla 4. Tratamientos contra las infecciones por VHC y DENV, y los sitios de acción

Actualmente, existe una vacuna para prevenir el dengue, se llama Dengvaxia (CYD-TDV) de Sanofi Pasteur, Dengvaxia fue autorizada y está disponible en algunos países para las personas de entre 9 y 45 años. La Organización Mundial de la Salud recomienda que la vacuna solo se administre a las personas que hayan tenido una infección anterior por el virus del dengue confirmada. [18, 23] En mayo del 2019, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) aprobó el uso de Dengvaxia en ese país en los niños de entre 9 y 16 años que vivan en un área en zonas endémicas de dengue. [18, 23]

1.4. LAS PLANTAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los primeros documentos escritos, que nos hablan acerca del uso de las plantas medicinales, los encontramos con una antigüedad de unos 4.000 años a.C. Tenemos también los ideogramas de los Sumerios escritos unos 2.500 años a.C., donde encontramos descripción de plantas usadas con fines medicinales. En el código de Hamurabi, unos 2.000 años a.C. encontramos como los babilónicos usaban ya muchas plantas para restaurar su salud; entre ellas tenemos: la menta, el sen, el beleño, ajo, adormidera, cáñamo, etc. [36, 37, 38]

Los egipcios y los griegos también dejaron documentos donde se comprueba el uso de los productos naturales en la salud. También se sabe cómo en la India también se han usado las plantas medicinales. Aunque en muchas regiones antiguas y aún recientes se ha visto como el uso de las plantas medicinales ha estado asociado a ritos mágicos y religiosos, de todas maneras, hay que destacar que este uso ha estado basado en un buen conocimiento de las plantas, adquirido por la experiencia y transmitido de padres a hijos por muchas generaciones. [36, 38, 39]

Las plantas medicinales son conocidas por ser fuente de nuevos medicamentos, debido a la presencia de los metabolitos secundarios; se estima

que a lo largo del tiempo se han utilizado muchas especies de plantas con fines terapéuticos. Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por las plantas, característicos de un rango limitado de especies, dichos metabolitos secundarios tienen un atractivo interés terapéutico, debido a que muchos tienen efecto biológico sobre otros organismos. [37, 29, 40]

Los metabolitos secundarios como lo son los polisacáridos, Flavonoides, Alcaloides, Terpenoides, Diterpenoides, Quinonas policíclicas y Fenólicas, etc. se obtienen por medio de diversos procesos de extracción y separación con la finalidad de aislar compuestos con potencial actividad terapéutica, pudiendo exhibir una gran variedad de actividades biológicas tales como antioxidantes, anticancerígenos, antibacterianos, antifúngicos y antivirales. [26, 40]

1.4.1. PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Existen estudios de caracterización de la actividad antiviral que presentan diversas plantas, teniendo ejemplo la actividad antiherpética (virus herpes simple 1 (HSV-1); virus herpes simple 2 (HSV-2); virus varicela zóster (VZV)) de extractos orgánicos y acuosos de las plantas cesa (*Callisia fragans*) y jojoba (*Simmondsia chinensis*) estudio realizado en Pensilvania, USA en el 2004. [41]

En Chile en el 2013 se realizó el estudio de los extractos orgánicos de hoja de aire (*Bryophyllum pinnata*), también han sido sujeto de estudios por sus propiedades antiviral papiloma humano tipo 18 (HPV-18) y por su actividad antineoplásica. [42]

Los extractos de té de castilla (*Lippia alba*), orégano (*Oreganum vulgare*) y artemisa (*Artemisia vulgaris*) han sido estudiados en el 2013 por sus propiedades de sus aceites esenciales sobre la actividad infectiva del virus de la fiebre amarilla, un importante patógeno en Sudamérica y África subsahariana. [36]

Del mismo modo, otro miembro de la familia de las asteráceas, la *Artemisia arborescens*, se determinó su actividad contra VHS-1 realizado en Chile, esta actividad se ha estudiado junto a su potencial administración en nanopartículas, lo que obviamente podría significar una ventaja en términos de disminuir la dependencia de administración tradicional. [41]

Estudios realizados en el 1990 en Minnesota sobre extractos de zarzamora demostraron que presenta una actividad antiviral contra VHS-1, e incluso efecto viricida en líneas celulares ya infectadas. También existen estudios realizados en guaicurú (*Limonium brasiliense*) y hierba de la perilla (*Margyricarpus pinnatus*) que muestran un nivel de actividad de más del 95% al compararlos con antivirales usados tradicionalmente contra infecciones por VHS-1, tales como aciclovir con 99% de actividad. [41, 42]

En el caso de goma arábiga (*Acacia nilotica*) se ha descrito de modo preliminar su actividad antiviral contra VHC con menos de un 50% de toxicidad frente al tratamiento tradicional dicho estudio fue realizado en el 2011 en Pakistán. En Chile, en el 2013 se determinó la actividad antiviral contra virus de hepatitis B (VHB) en extractos de cúrcuma (*Curcumin longa*). [41-44]

Las investigaciones sobre conocidas plantas medicinales chinas, como el huang-qin (*Scutellaria baicalensis*), han demostrado capacidad antiviral contra DENV2, además de tener actividad antiherpética. [45] Esta actividad ha sido corroborada también con plantas medicinales de uso en Malasia como las flores de hoja (*Phyllanthus* sp). [46] Otras investigaciones en las cuales se determinó que extractos de algas de *Spirogyra* spp. presentando actividad contra HSV-1 y HSV-2. [47]

En México, existen diversas plantas con actividad antiviral como lo es *Callisia fragans* que se localiza en el sur de México y *Simmondsia chinensis* localizada en la frontera entre México y USA. Este estudio fue realizado en Israel en el 2010 demostrando la actividad *in vitro* frente al VHS-1. [48] Otra

planta que es endémica de México que presenta actividad antiviral *In vitro* es el caso de *Jatropha dioica*. [37]

1.4.2. *Jatropha dioica*

La *Jatropha dioica* es un arbusto de flores pequeñas poco vistosas, de 30 a 60 centímetros de altura, con tallos negro-rojizos y raíces tuberosas que al ser cortadas brota un líquido semejante a la sangre; por esto la población la conoce como “sangre de drago” o “sangre de grado”. [37, 38, 49]

La planta se encuentra en varios municipios del estado de Nuevo León y además en San Luis Potosí, Chihuahua, Coahuila, Estado de México, Hidalgo y Guanajuato. El hábitat de esta especie es en climas secos, con suelos pedregosos sobre las sierras, es una especie capaz de crecer en zonas en donde es difícil el crecimiento de otras plantas. *J. dioica* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, dicha familia es ampliamente conocida por ser una fuente promisoría de metabolitos secundarios con amplias propiedades terapéuticas, entre las cuales se encontró la actividad contra VHS-1 y VHS-2. [37, 38, 49]

El género *Jatropha* comprende cerca de 200 especies que se encuentran ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de América y Asia. [37, 49] Es una fuente rica de fitoquímicos tales como alcaloides, flavonoides, lignanos, péptidos tricíclicos, fitoesteroles y terpenos con un amplio rango de actividades biológicas como; antitumoral, citotóxica, antibacteriana, antiinflamatoria, molusquicida, insecticida, fungicida y antiviral. [37, 49]

En la medicina tradicional *J. dioica* es utilizada en comunidades rurales para tratar infecciones bacterianas, micóticas, virales, periodontitis, salpullido y alopecia. [37, 49]

La *Jatropha dioica*, se determinó que posee actividad antiherpética, de la cual, el extracto hidroalcohólico presento mayor actividad. En la familia de Euphorbiaceae y del género *Jatropha* existen casos en el que dichas plantas, suelen presentar actividad antiviral de amplio espectro (AAAE), es decir que puede ser utilizadas en el tratamiento contra más de una sola enfermedad generada por infecciones virales, tales como Influenza, infección por VIH, Dengue, Hepatitis, entre otras; esto genera ventajas, que van desde la cobertura de múltiples virus y genotipos, reducción de la complejidad del tratamiento y en algunos casos la disminución de la probabilidad de desarrollar cepas virales resistentes. [37]





Capítulo 2. ANTECEDENTES

Existen numerosos estudios usando la medicina tradicional en busca de posibles actividades antivirales que las plantas pudieran presentar, tales como los realizados en el 2009, por Rocío Meneses y colaboradores, donde evaluaron la actividad antiviral de aceites esenciales de plantas colombianas como la Verbena (*Lippia citriodora*) y el Laurel (*Pimenta racemosa*) contra el DENV y el virus de fiebre amarilla (VFA) observando que poseen la capacidad de reducir las unidades formadoras de placas, hasta en un 100 % empleando 100 µg/mL, dichos estudios fueron realizados de manera *in vitro* en células Vero. [50]

Un análisis fue realizado por Sati Latifah y colaboradores en el 2013, donde su grupo de trabajo revisaron 31 potenciales plantas medicinales con actividad antidengue, llegando a la conclusión que los extractos hidroalcohólicos presentan actividad antiviral, estableciendo que estructuras de tipo polisacáridos y flavonoides eran las posibles responsables de la actividad antiviral, de estos trabajos fueron realizados de manera *in vitro* empleando células Vero y C6/36. [51]

Así mismo, Róbson Teixeira y Sergio Olivera en el 2014, realizaron un cribado en productos naturales con potencial actividad contra el virus del dengue, en donde concluyeron que moléculas del tipo polisacáridos, flavonoides, alcaloides, terpenoides y fenólicos son los que confieren la actividad antiviral evaluados de manera *in vitro* en líneas celular Vero y Huh-7 (células de hepatocarcinoma humano). [52]

También se cuentan con estudios donde se busca la actividad antiviral contra el VHC, como el caso de Tutik Sri Wahyuni y colaboradores, donde usaron las hojas de *Ruta angustifolia* de la cual aislaron dos compuestos

(Chalepina y Pseudina) que presentan la actividad anti-VHC, con una concentración inhibitoria (CI_{50}) de 1.7 ± 0.5 y 1.4 ± 0.2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. [53] Así mismo, el grupo de trabajo de Usman A. Ashfaq y Sobia Idrees, realizaron una revisión bibliográfica donde evaluaron cientos de especies vegetales y sus fito constituyentes que se han aislado que presentan actividad antiviral contra el VHC, y algunos han demostrado tener un gran valor medicinal en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades virales en ensayos clínicos y preclínicos. [54] destacando los principales en la tabla 5.

FITOQUIMICO	PASO VIRAL	EFEECTO
Diosgenina [55]	Replicación	Redujo la fosforilación del transductor de señal y el activador de la transcripción 3.
Silimarina / silibinina [54, 55, 56]	Entrada viral (unión viral) Replicación	Inhibición de la proteína núcleo y NS5 ARN-ARN polimerasa dependiente (RdRp)
Iridoides [57, 58]	Entrada viral	Bloqueo de contacto E2 y CD81
Naringenina [59, 60]	Ensamblaje viral	Supresión de la actividad proteica de núcleo
EGCG [61, 62]	Entrada viral	Inhibición de la unión viral a los hepatocitos.
Quercetina [63, 64]	Replicación	Inhibición de la actividad de IRES y NS3 polimerasa
Ladaneína [65]	Entrada viral (unión viral)	Inhibición de interacciones del receptor, endocitosis viral o fusión de membrana
Luteolina / apigenina [66]	Replicación	Inhibición de la actividad de la polimerasa NS5B

Tabla 5. Fitoquímicos de las plantas medicinales como agentes contra el VHC.

2.1. ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro grupo de trabajo, se realizó un estudio en el 2013 evaluando plantas endémicas del noreste de México con actividad antiherpética, en la cual se determinó que el extracto hidroalcohólico de *J. dioica* tiene actividad antiherpética contra VHS1 y VHS-2 con una IC_{50} de 280 y 370 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. [67] En el 2014, un estudio del extracto hidroalcohólico de la *J. dioica*, presentó actividad contra el virus de VHS-1 y VHS-2 con valores de CI_{50} de 283 y 368 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, también se determinó el índice de selectividad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, obteniendo 2.23 y 1.72 respectivamente; Usando las células Vero como modelo experimental. [37]

A partir de este extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, se obtuvo un compuesto conocido como Rioloatriona por medio de un aislamiento biodirigido. Rioloatriona, es un compuesto tipo diterpeno, el cual mostró una CI_{50} de 66 $\mu\text{g/mL}$ para ambos virus, y una CC_{50} de 384 $\mu\text{g/mL}$. Teniendo como índice de selectividad de 5.8 para VHS-1 y VHS-2. Hasta la fecha no se han encontrado reportes siendo este el único antecedente del uso de *J. dioica* como terapia antiviral. [37]

En el 2015, se realizó un estudio evaluando la actividad antiherpética de extractos de plantas endémicas de México, obteniendo que las plantas investigadas pueden ser consideradas con actividad específica contra el VHS-2, obtenido una CI_{50} del extracto de las plantas de: *J. mollis* (en Metanol de 126 $\mu\text{g/mL}$), *P. americans* (en Metanol 168.36 $\mu\text{g/mL}$), *H. patens* (en Metanol 219.08 $\mu\text{g/mL}$), *S. texana* (hidroalcohólico de 75.4 $\mu\text{g/mL}$), *S. bellotaeflora* (hidroalcohólico de 16.1 $\mu\text{g/mL}$), *C. coeruleus* (en agua de 282.4 $\mu\text{g/mL}$ y en Acetato de etilo de 253.4 $\mu\text{g/mL}$). [68] En el 2018, se evaluó la actividad viricida y protectora de Rioloatriona contra VHS-1, obtenido que presenta una actividad protectora a las 1 y 12 horas pretratamiento. [70]

Por otro lado, se cuenta con amplia experiencia en el uso de modelos de estudio de VHC, en trabajos realizados por nuestro grupo de trabajo. En el 2013

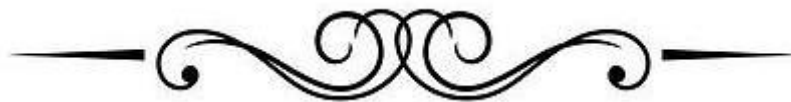
como parte de la tesis de maestría, [71] se evaluó el efecto de las proteínas estructurales y no-estructurales del VHC en la expresión de COX-2, en donde se trabajó con las líneas celulares Huh-7 parental transfectadas con el plásmido pFK1 (expresa NS3), pNS5A (expresa la proteína NS5A) y pE2 (expresa la proteína de envoltura E2) por medio de *virus de vaccinia*. En el cual se concluyó que existe una expresión diferencial de la enzima COX-2 y las proteínas virales analizadas (NS5A, E2) en la línea celular Huh-7. [71]

En el 2015 se evaluaron los perfiles de respuesta a interferón inducidos como respuesta a la infección con el virus del dengue, en el cual se obtuvo, aisló, caracterizó y cuantificó partículas virales infectivas a partir de 386 sueros de sujetos infectados con el DENV que se sembraron en la línea celular C6/36. En la cual, se aislaron 13 virus a partir de sujetos virémicos: 6 DENV-1, 6 DENV-2 y 1 DENV-4. Todos se caracterizaron por métodos moleculares para garantizar el haber obtenido cepas diferentes y de serotipo único. Los virus aislados son funcionales, capaces de generar enfermedad en sistemas *In vivo* y de infectar líneas celulares. [28]

En el 2016, se evaluó la participación de la S-Adenosil Metionina (SAM) y su mecanismo de acción en la regulación de la expresión génica del VHC, en la cual se empleó Huh-7 replicón, conteniendo un replicón subgenómico del VHC, que expresa constitutivamente las proteínas no estructurales del VHC. Además, se utilizó la línea celular Huh-7 parental, que no contiene las proteínas virales, como línea control. En la cual se observó que SAM inhibe la replicación del VHC a nivel transcripcional y el efecto es dosis y tiempo dependiente. [72]

Dentro de este nuevo enfoque nos interesa conocer si existe una actividad anti-VHC y anti DENV por parte del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*. Determinado CC_{50} en las líneas celular a emplear, después determinar si existe una reducción de la expresión de ARN viral en presencia del extracto.





Capítulo 3. JUSTIFICACIÓN

La infección por el VHC y el DENV, son un problema de salud a nivel mundial, y en México, ambas infecciones son de importancia clínica y aunque para el VHC existen tratamientos antivirales de acción directa; para la infección por DENV, actualmente no existe un tratamiento específico, por lo cual el manejo clínico del paciente requiere del control de la sintomatología presente. Debido a lo anterior es necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. Es aquí donde el uso de plantas medicinales retoma una importancia como una fuente importante de compuestos con actividad antiviral.

En nuestro grupo de trabajo, se ha descrito que *J. dioica* presenta actividad contra virus de ADN como lo son VHS-1 y VHS-2, se sabe que pertenece a la familia de Euphorbiaceae, y el género *Jatropha* existen casos en el que dichas plantas, suelen presentar actividad antiviral de amplio espectro (AAAE), con ello podría presentarse actividad contra virus de ARN, tal como virus de hepatitis C y el virus de dengue.





Capítulo 4. OBJETIVOS

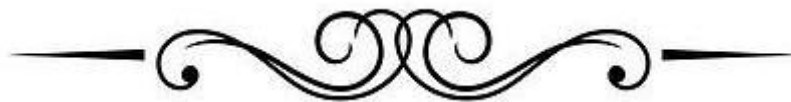
4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* contra el virus del Dengue (DENV-2) y el virus de Hepatitis C (VHC) *In vitro* en líneas celulares C6/36, Vero y Huh-7.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la *J. dioica* en líneas celular C6/36, Vero y Huh-7 determinando la CC₅₀.
2. Evaluar la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* contra el virus del dengue en líneas celulares C6/36 y Vero.
3. Evaluar la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* contra el virus de la hepatitis C en línea celular Huh-7.





Capítulo 5. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, en colaboración con el Departamento de Química Analítica ambas pertenecientes a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. Durante el periodo agosto 2016 – agosto 2017.

1.2. REACTIVOS

- **SOLUCIONES DE USO GENERAL.**

La limpieza de trabajo se realizó con solución de Dodecil Sulfato de Sodio o; Marca USB. Cat. S5010) al 10 %; así como con el uso de Etanol desnaturalizado (Etanol desnaturalizado; marca Jaico, México) al 70%, ambas con agua destilada.

- **CULTIVO CELULAR**

El cultivo de líneas celulares Vero, Huh7 parentales, Huh7 replicón, y C6/36 se realizará en campana de flujo laminar BSL-2 con filtros HEPA (Marca Lumistell; Celaya, Guanajuato, México). Para el mantenimiento de las líneas celulares VERO, Huh7 parentales y Huh7 replicón, se empleó medio de cultivo Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (ADMEM, Gibco, Invitrogen, EUA) suplementado con L-glutamina (200 mM, 100x), suero bovino fetal,

antibiótico Penicilina-Estreptomicina (100UI/mL de Penicilina G sódica y 100 µg/mL de sulfato de Estreptomicina), Aminoácidos no esenciales (10 mM, 100x) todos de la marca In vitro, S.A. (México, D.F.). Mientras que para la línea C6/36, se empleó el medio Leibovitz (L-15) suplementado con suero bovino fetal (SBF) (Hyclone), aminoácidos no esenciales (100x), solución de antibiótico antimicótico (100x, Penicilina/estreptomicina/Anfotericina B) y Bicarbonato de Sodio al 7.5 % esterilizado por membrana, todos de la marca In vitro S.A (México, D.F.).

- RECuento Y VIABILIDAD CELULAR.

Se inició a partir de tener las células resuspendidas, se realizó una dilución (1:8) con medio de cultivo y el colorante vital Azul Tripano 0.4% (GIBCO-BRL, NY), y se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer.

- INFECCIÓN VIRAL DE CULTIVOS.

Para la infección con DENV, las células Vero, C6/36 se emplearon los mismos reactivos descritos en el apartado de cultivo celular. En el caso de VHC, se utilizó un modelo de replicón (Huh7 replicón) que se describirá más adelante.

- EXTRACCIÓN DE ARN

Para la extracción ARN total a partir de células en mono capa o aislado de cultivo viral, se empleó el reactivo TRIzol (marca Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Cloroformo (marca Fischer Scientific, New Jersey, USA) Etanol (marca Merck, Darmstadt, Alemania), Isopropanol ((marca Fischer Scientific, New Jersey, USA)) e inhibidor de RNAsas (RNA out) de la compañía Invitrogen

(Carlsbad, CA, USA) y para todas las soluciones acuosas utilizadas, se empleó agua ultrapura tratada con el inhibidor de ARNasas Dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma Aldrich).

- RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)

Para la síntesis de ADN complementario a partir de ARN total, se utilizó la enzima RT-MMLV, Buffer RT 5x, Random primers, Ditiotritol (DTT), Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) e inhibidor de ARNasas (RNA out), todos de la compañía Invitrogen (USA).

- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación del ADN complementario se realizó empleando la enzima Taq DNA Polymerase recombinante, Buffer para PCR sin Mg²⁺ (10x) y Cloruro de Magnesio (MgCl₂) (50 mM) (Invitrogen, USA), los primers utilizados (D2, TS2) fueron de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

1.3. MATERIALES DE USO GENERAL

- USO GENERAL

- Pipetas serológicas de 2 (Fisherbrand. Cat. 13-678-11C), 5 mL (Corning. Cat. 4487) y 10 mL. (Corning Cat. 4488)
- Tubos falcón de 15 mL (Corning. Cat. 430053) y 50 mL. (Corning)
- Toallas desechables de papel "Sanitas" (Kimberly Clark)
- Puntillas desechables blancas (10 µL) para micropipeta. (Axygen)
- Puntillas desechables amarillas (200 µL) para micropipeta. (Axygen)
- Puntillas desechables azules (1mL) para micropipeta (Axygen)

- CULTIVO CELULAR

- Botellas para cultivo celular de 25 cm², con y sin filtro. (Corning Cat. 430639.)
- Botellas para cultivo celular de 75 cm², con y sin filtro. (Corning Cat. 430641)
- Raspadores celulares de 25 cm. (Corning. Cat. 3010)
- Pipeta Pasteur. (Corning Cat. 101001440.)
- Placas para cultivo de 6, 12 y 96 pozos (Corning Cat. 3506, Cat. 3526)
- Crioviales de 2 mL. (Corning Cat. 430659)
- Microtubos de 0.2, 0.6, 1.5, 2 mL. (Axygen. Cat. PCR-02-C1)

- TÉCNICAS MOLECULARES

- Tubos ópticos para qPCR (tiras de 8 tubos). (Applied Biosystems s. Part. 4323032.)
- Tapas ópticas para tubos de qPCR. (Applied Biosystems Part. 4316567)
- Puntillas desechables blancas con filtro. (10 µL) (Rainin)
- Puntillas desechables amarillas con filtro. (200 µL) (Rainin)
- Agarosa Ultrapura (Invitrogen, USA)

- EQUIPOS DE USO GENERAL

- Centrífuga clínica. (Thermo Scientific Modelo IEC-CLR30R)
- Centrífuga refrigerada. (Heraeus Modelo Biofuge Primo R)
- Microcentrífuga. (Eppendorf Modelo 5415D.)
- Microscopio invertido (Olympus Modelo CKX41)
- Ultracongelador Revco (Nuair Modelo UN-6617A36)
- Ultracongelador Revco (Thermo Scientific)
- Pipetor Pipet-Aid XP (Drummond Modelo 4-000-101)
- Baño maría (PRECISION)

- Micropipetas de 10, 200 y 1000 μ L (Rainin)
- Vortex (Vortex Genie 2 G-560)

- CULTIVO CELULAR
 - Campana de flujo laminar clase 2 con filtro HEPA. (Marca NUAIRE. Modelo NU-425-400.)
 - Incubadora con fuente de CO₂ (NUAIRE. Modelo UN-4750)
 - Incubadora sin fuente de CO₂ (Marca Labnet Microincubator. Modelo I5110)
 - Bomba de presión y vacío (Marca Daigger. Cat. EF2090G)

- TÉCNICAS MOLECULARES
 - Campana de PCR (CBS Scientific Co. Modelo P-036-02.)
 - Termociclador para retrotranscripción (Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700)
 - Termociclador para PCR punto final (Eppendorf. Modelo Mastercycler gradient)
 - Termociclador para qPCR (Applied Biosystems Modelo ABI PRISM 7000 y 7500 fast)
 - Fotodocumentador UVP Mini Darkroom (Cambridge, UK) Modelo M-26E)
 - Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
 - Cámara de electroforesis (Owl Modelo B1A)
 - Fuente de poder (Bio-Rad Power Pac 100)
 - Horno de microondas (Panasonic)

1.4. MATERIAL BIOLÓGICO

En este trabajo, se emplearon las líneas celulares C6/36, Vero, Huh-7 parental y Huh-7 replicón, que a continuación se describen.

1.4.1. LÍNEAS CELULARES

- CÉLULAS C6/36

Las células C6/36, provienen de una clona obtenida de la línea original de *Aedes albopictus* establecida por Singh (1967), presenta una alta sensibilidad para la infección por DENV, para el mantenimiento de esta línea celular, se empleó el medio Leibovitz (L-15) suplementado al 5-10 % con suero bovino fetal, y se incubaron a 28°C en ausencia de CO₂ y en botellas de cultivo cerrada.

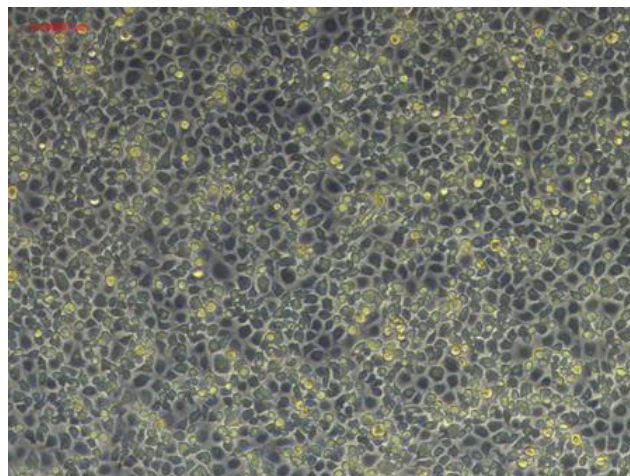


Figura 14. Microfotografía de una monocapa de células C6/36. Se observa la microfotografía a 40x de la mono capa de células C6/36.

- CÉLULAS Vero

Las células Vero, son obtenidas a partir de las células epiteliales del riñón de mono verde africano (*Chlorocebus sabaeus*), fueron empleadas como un modelo de infección por el DENV. Para el mantenimiento de las células Vero, se empleó medio ADMEM suplementado al 2 % suero bovino fetal, y se incubaron a 37°C a 5 % de CO₂.

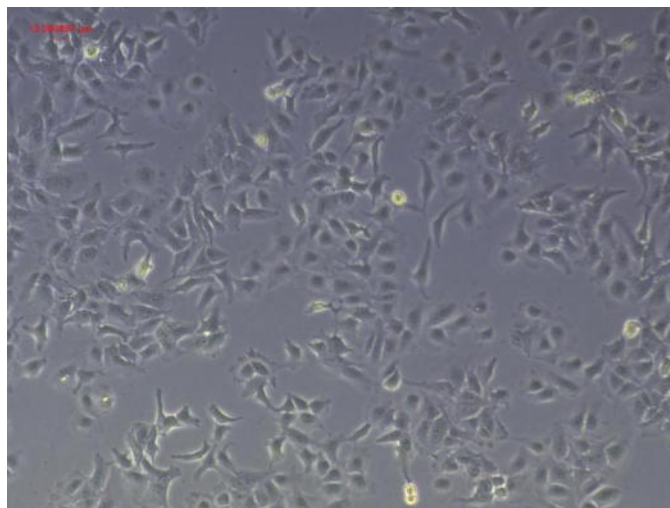


Figura 15. Microfotografía de una monocapa de células Vero. Se observa la microfotografía a 40x de la mono capa de células Vero.

- CÉLULAS Huh-7 PARENTALES

Las células Huh-7 (JTC-parentales, son células de hepatocarcinoma humano, que se utiliza como modelo para el VHC, para su mantenimiento, se empleó medio ADMEM suplementado al 2 % suero bovino fetal, y se incubaron a 37°C a 5 % de CO₂.

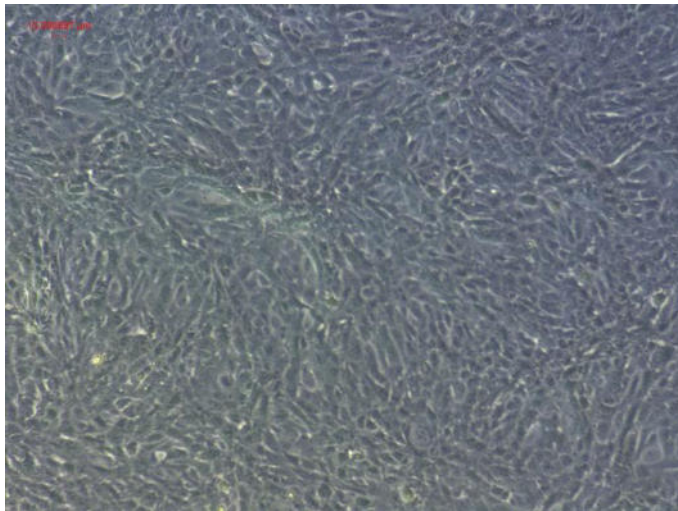


Figura 16. Microfotografía de una monocapa de células Huh-7 parentales. Se observa la microfotografía a 40x de la mono capa de células Huh-7 parentales.

- CÉLULAS Huh-7 REPLICÓN

Las células Huh-7 replicón, son células de hepatocarcinoma humano que expresan constitutivamente proteínas virales, que se utiliza como modelo de infección para el VHC, para su mantenimiento se empleó medio ADMEM suplementado al 2 % SBF, y se incubaron a 37°C a 5 % de CO₂.

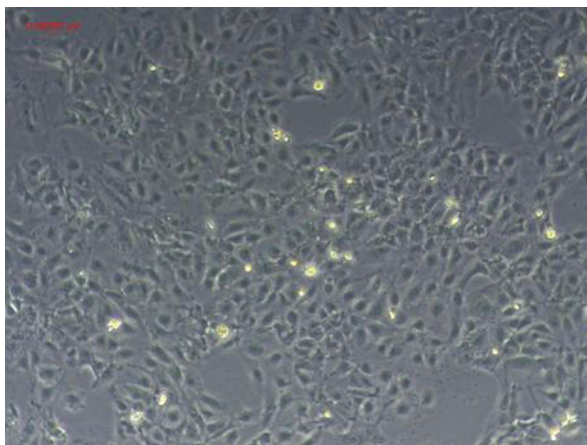


Figura 17. Microfotografía de una monocapa de células Huh-7 replicón. Se observa la microfotografía a 40x de la mono capa de células Huh-7 replicón subgenómico que expresa constitutivamente proteínas de VHC.

1.4.2. EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Jatropha dioica*

El extracto hidroalcohólico proveniente de la raíz de *J. dioica* fue proporcionado por el Dr. C David Silva Mares, perteneciente al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para el uso del extracto, a partir de un concentrado el cual se conservó a 4°C hasta su uso, se realizó una solución stock; utilizando como disolvente el medio de cultivo correspondiente para cada línea celular empleadas en este proyecto manteniéndolo a temperatura ambiente y homogenizando por agitación, la cual se prepararon en condiciones de esterilidad antes al momento de su uso.

1.4.3. VIRUS

La cepa viral utilizada fue previamente caracterizada y no presentan contaminación con otras cepas, en esta tesis fue el virus del dengue prototipo 2 (DENV-2) cepa H-17247 de Nueva Guinea. (1972) (GeneBank ID: M29095.1)

1.5. ESTRATEGIA GENERAL

A partir de los cultivos celulares de C6/36, Vero y Huh-7 parenteral, se realizó los ensayos para la determinación de la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) utilizando diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico (50, 100, 200, 300, 400, 500 y 1,000 µg/mL) de *J. dioica* y se incubó por 48 y 72 horas, transcurrido este periodo, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Se utilizó como control negativo la viabilidad de los cultivos celulares de C6/36, Vero y Huh-7 parenteral sin exposición al extracto. La CC₅₀ se determinó como la concentración de extracto, necesario para reducir la

viabilidad celular en un 50%, tomando como 100% de viabilidad celular el control negativo.

Una vez determinada la CC_{50} , se permitió la infección del virus dengue tipo 2 (DENV-2) a las líneas celulares Vero y C6/36; y se empleó el modelo de Huh-7 parenteral y Huh-7 replicón para el virus de hepatitis C (VHC). Después de realizar el modelo de infección, se añadió el tratamiento con el extracto hidroalcohólico (50, 100, 200, 300, 400, 500 y 1,000 $\mu\text{g/mL}$) de *J. dioica* proporcionado por el Departamento de Química Analítica y se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) mediante la cuantificación de ARN del virus del dengue (DENV-2) y del virus de hepatitis C (VHC) mediante el uso RT-qPCR (figura 18).

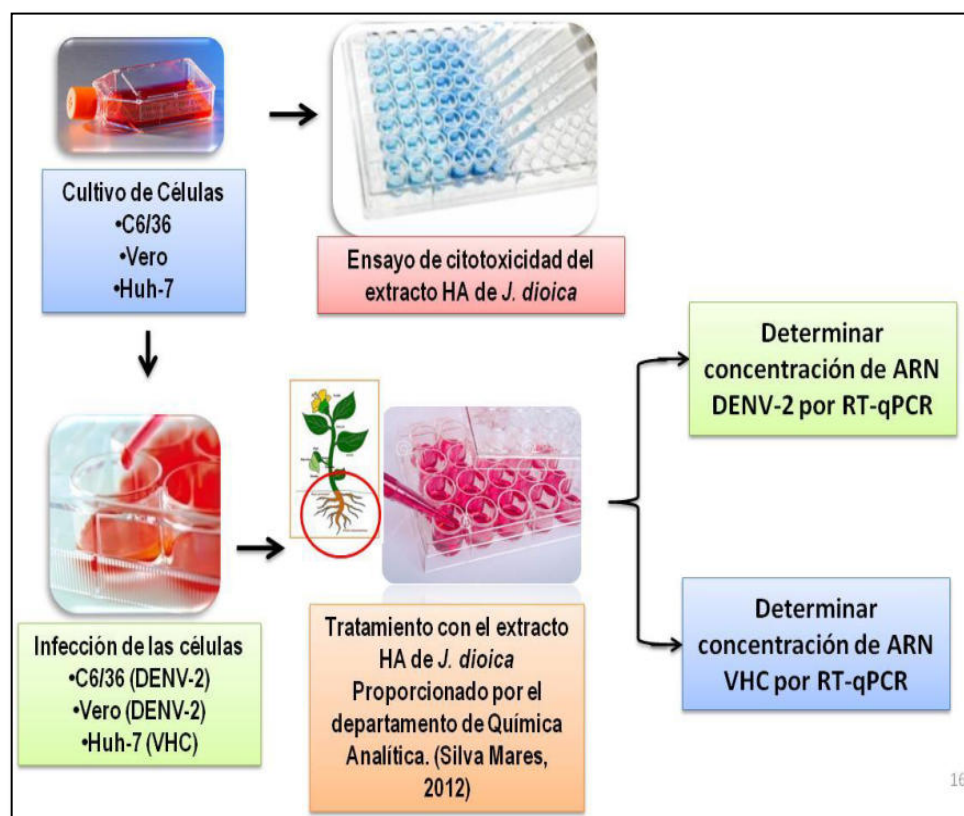


Figura 18. Estrategia general

1.5.1. CULTIVO CELULAR

- CÉLULAS C6/36.

Los cultivos de las células C6/36, se realizaron por división proporcional generalmente cada semana en botellas de 25 cm² para la obtención de mono capas semiconfluentes, los pasajes se realizaron de manera mecánica con el uso de un raspador de hule o por agitación.

- CÉLULAS Vero, Huh-7 PARENTALES Y REPLICÓN.

Para estas líneas celulares, se mantuvieron con medio ADMEM suplementado al 2 %, haciendo pasajes generalmente cada 4 o 5 días, o al alcanzar el 90 % de confluencia. Para realizar los pasajes, se realizó por medio de la hidrólisis enzimática de la matriz extracelular con ayuda de Tripsina-EDTA 0.25 % a 37 °C, después de 5 a 10 min, se neutraliza la actividad enzimática añadiendo medio ADMEM al 2 % SBF en proporción 1:1.

1.5.2. GENERACIÓN DEL BANCO VIRAL DE DENV-2

Para la obtención de cosechas del DENV-2, se permitió la infección con el virus de referencia en células C6/36, una vez generada la infección evidenciándose por la presencia de efecto citopático observado por microscopia, se realizó el raspado con ayuda de un raspador de hule. Una vez removido todo el material adherido a la superficie de la botella de cultivo, se generaron alícuotas de 150 µL en tubos de 0.2 mL. Las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su uso, previamente etiquetados con el serotipo viral, fecha de la cosecha.

1.5.3. CONFIRMACIÓN MOLECULAR Y SEROTIPIFICACIÓN DE DENGUE.

El protocolo de Lanciotti para serotipificación del virus del dengue, consiste en una retrotranscripción seguida de una amplificación del cADN para la obtención de amplicones con tamaño distinto para realizar una serotificación diferencial dependiendo del DENV presente.[6] Esta PCR anidada consiste en 2 fases. La primera fase consiste en una amplificación universal para el DENV, esperando una banda universal de 511 pb, para ello se utilizaron oligonucleótidos universales para DENV (D1. 5-TCA ATA TGC TGA AAC CGC GCG AGA AAC CG-3) (D2. 5-TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA AGG TTC-3). La segunda fase consiste en la utilización de oligonucleótidos serotipo específicos (TS1, TS2, TS3, TS4) en la cual se obtiene un patrón diferencial de bandas según sea el serotipo del virus (DENV-1 482 pb, DENV-2 119 pb, DENV-3 290 pb y DENV-4 392 pb).

PCR D1-D2		PCR D1-TS2	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Agua Mili Q	13.8 µL	Agua Mili Q	13.8 µL
Buffer PCR 10x	2 µL	Buffer PCR 10x	2.5 µL
MgCl ₂ 50 nM	1.5 µL	MgCl ₂ 50 nM	1.5 µL
dNTPs 10 nM	0.5 µL	dNTPs 10 nM	0.5 µL
Oligo D1 10 µM	0.7 µL	Oligo D1 10 µM	1 µL
Oligo D2 10 µM	0.7 µL	Oligo TS2 10 µM	0.5 µL
Taq polimerasa	0.3 µL	Taq polimerasa	0.3 µL
cADN	5 µL	cADN	5 µL
Volumen total	25 µL	Volumen final	20 µL

Tabla 6. Condiciones de reacción para la detección molecular de DENV-2

El programa en el termociclador para realizar la PCR anidada fue el siguiente:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
1	94	5 minutos	1
2	94	1 minuto	40
3	60	40 segundos	
4	72	40 segundos	
5	72	10 minutos	1
6	4	esperar	

Tabla 7. Programa de temperatura para la detección molecular del virus de dengue.

Los productos amplificados se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con Bromuro de Etidio. Los geles se corrieron a 100 V durante 1 hora.

1.5.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CITOTÓXICA 50 (CC₅₀) EN LAS LÍNEAS CELULARES

Se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad, en una placa de 96 pocillos con medio Advanced-DMEM suplementado, se incubó 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, esto en el caso de las líneas celulares Vero y Huh7 parentales; mientras que para las células C6/36, se utilizó medio L-15 suplemento, y se incubó 24 h a 28°C en ausencia de CO₂.

Se retiró el sobrenadante y se reemplazó con medio fresco con diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico (50, 100, 200, 300, 400, 500 y 1,000 µg/mL) y se incubó nuevamente por 48 y 72 h.

Se utilizó como control negativo células sin exposición al extracto. Después de tres días de incubación, la viabilidad celular se determinó mediante la adición de 10 µL de una solución de 5 mg/mL de MTT por pozo, se incubaron 3 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo fue removido,

200 μ L de DMSO se añadieron para disolver los cristales de formazán y se midió la absorbancia a 570 nM. Posteriormente se graficaron curvas de dosis respuesta de las diferentes concentraciones utilizadas. La CC_{50} se determinó como la concentración de extracto, necesario para reducir la viabilidad celular en un 50%, tomando como 100% de viabilidad celular el control negativo.

1.5.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN de ARN DEL VIRUS DE DENGUE PROTOTIPO 2.

La actividad antiviral del extracto hidroalcohólico se determinó utilizando el ensayo qPCR, a partir de un formato en placa de 6 pozos y se incubaran las células C6/36 y Vero con 10 μ L del DENV-2 durante 1 h, a 37 °C. Posteriormente, el sobrenadante se desechó y se agregó medio fresco según la línea celular, con DMSO al 1% y 1.6% de Carboximetilcelulosa.

Se añadió el extracto hidroalcohólico a las placas a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μ g/mL y se incubaron por 48 y 72 h. Se utilizaron para los ensayos controles de crecimiento celular, control negativo el cual consiste en células con el extracto; y células infectadas y sin extracto control positivo de infección.

1.5.6. MODELO DE ESTUDIO CON VHC: MODELO DE REPLICÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN DE VIRUS DE HEPATITIS C.

La actividad antiviral del extracto hidroalcohólico se evaluó utilizando el ensayo qPCR, a partir de un formato en placa de 6 pozos y se incubaron las células Huh7 replicón y se incubó por 1 h a 37 °C. Posteriormente, el sobrenadante se desechó y se agregó medio fresco ADMEM 1% SBF.

Se añadió el extracto hidroalcohólico a las placas a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL y se incubó por 48 y 72 h. Para este ensayo se empleó controles de crecimiento celular, se utilizaron células Huh-7 parentales (sin expresión de ARN del VHC) como control negativo y como control positivo de infección (Mock, son células transfectadas con plásmido), se empleó células Huh-7 replicón (que expresión constitutivamente las proteínas no estructurales de VHC) sin tratamiento del extracto hidroalcohólico.

1.5.7. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

La extracción de ARN se realizó con el uso de TRIzol, en proporción 1:1 con respecto al volumen del aislado viral. Siguiendo el siguiente protocolo:

1. En caso de extracción de ARN de células en monocapa, primero se removi6 el medio de cultivo para permitir el contacto directo del TRIzol con las células.
2. Se adicion6 el TRIzol a la botella o tubo conteniendo las células
3. Se incub6 por 5 minutos para permitir la disociaci6n completa de los complejos de nucleoproteínas. En el caso de estar realizado la extracci6n a partir de células en monocapa, en este paso el contenido en la botella debe ser transferido a un tubo eppendorf de 2 mL.
4. Posteriormente, se adicion6 200 µL de Cloroformo frio por cada mililitro de TRIzol empleado. Se mezcl6 por inversi6n durante 15 segundos. Y se incub6 en hielo por 3 minutos.
5. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C
6. Se recuper6 en tubo de 1.5 mL el sobrenadante transparente obtenido despu6s de la centrifugaci6n, es en esta fase donde se encuentra el ARN. Para su precipitaci6n se a6adi6 500 µL de Isopropanol por cada mililitro de TRIzol empleado.
7. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C

8. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de ARN se lavó con 1 mL de Etanol al 70% en agua DEPC por cada mililitro de TRIzol empleado.
9. Se mezcló en Vórtex
10. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C
11. Por último, se removió el Etanol residual y el ARN se resuspendió en agua DEPC, empleando de 10 a 30 µL dependiendo del tamaño de la pastilla obtenida.

1.5.8. RETOTRANSCRIPCIÓN (RT-MMLV)

Una vez realizada la extracción de ARN total, esta fue cuantificada por medio de espectrofotometría por NanoDrop y posteriormente sujeta a retrotranscripción utilizando la enzima MMLV. Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Random primer 10x	1 µL
ARN	5 µL
Agua DEPC	6.5 µL
Volumen total	11.5 µL

Tabla 8. Condiciones de reacción para la RT. Primera mezcla

Una vez preparada la primera mezcla, se introdujeron los tubos al termociclador para incubarlos a 72°C durante 10 minutos. Mientras tanto, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Buffer RT 5x	4 µL
DTT 0.1 M	2 µL
RNAse out	0.5 µL
dNTPs 10 mM	1 µL
RT-MMLV 200U/mL	1 µL
Volumen total	8.5 µL

Tabla 9. Condiciones de reacción para la RT. Segunda mezcla.

Transcurrido el tiempo de incubación de los tubos en el termociclador, se incubaron durante 3 minutos en hielo y se añadió los 8.5 µL de la segunda mezcla de reacción por cada tubo. Posteriormente se continuó con el siguiente programa en el termociclador:

Paso	Temperatura	Tiempo
1	25 °C	10 minutos
2	37 °C	60 minutos
3	94 °C	5 minutos
4	4 °C	10 minutos

Tabla 10. Programa de reacción de retrotranscripción

Terminando el programa, los tubos se retiraron del termociclador, se rotularon y se almacenaron a -80 °C.

1.5.9. RT-qPCR PARA DENV-2

Obtenida los ARN, se procederá a realizar la PCR en tiempo real por medio de la enzima SuperScript III RT/Platinum One—step qRT-PCR bajo las

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Incubación Final
Repetición	1	1	45	
Temperatura (°C)	50	95	95	60
Tiempo	30 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto

siguientes condiciones:

Para ello se prepara la mezcla de trabajo detallada en la siguiente tabla.

Reactivo	1 rx.(μL)
Agua grado PCR	6.57
<i>SuperScriptTM III RT/Platinum® Master Mix 2x</i>	12.5
Iniciador Sentido para Dengue 2 a 100 μM	0.125
Iniciador Antisentido para Dengue 2 a 100 μM	0.125

Tabla 11. Condiciones de reacción para la RT-qPCR

Sondas para Dengue Serotipo 1,2,3 y 4 a 100 μM	0.045
<i>SuperScriptTM III RT/Platinum® Taq Mix</i>	0.5
Muestra	5
Total	25

Tabla 12. Reactivos para mezcla de RT-qPCR con Enzima SuperScriptTM III

El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV se utiliza con el instrumento para PCR en tiempo real 7500 Fast Dx de ABI. El ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV. Las sondas marcadas con fluorescencia se aparean con fragmentos de ADN amplificados y la intensidad de la señal fluorescente es monitoreada por el instrumento 7500 Fast Dx de ABI durante cada ciclo de PCR. La amplificación del objetivo se registra como aumento de la fluorescencia a lo largo del tiempo en comparación con la señal de fondo. [73]

1.5.10. qPCR PARA VHC

Para la PCR cuantitativa se utilizó un ensayo que contiene la sonda TaqMan y los iniciadores diseñados sobre regiones para NS5A. Así mismo, se utilizó el reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Los volúmenes de reacción fueron los siguientes:

Reactivos	1 rx(μL)
Buffer Universal Master Mix	10
sonda Taqman VHC	1
H ₂ O	4
cADN	4
Total	20

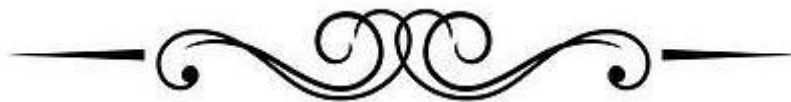
Tabla 13. Reactivos para mezcla de qPCR para VHC

Para normalizar los resultados de expresión se utilizó el ensayo de β -Actina 20X también de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Cada condición se realizó por triplicado. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR System de Applied Biosystems.

1.5.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los experimentos se realizarán por triplicado y las variables fueron evaluadas mediante T de student de variables independientes (SPSS 15.0v). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p \leq 0.05$.





Capítulo 6. RESULTADOS

6.1. CITOTOXICIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA *J. dioica* EN LÍNEAS CELULARES C6/36, VERO Y HUH-7 DETERMINANDO LA CC₅₀.

Se evaluó la CC₅₀ del extracto hidroalcohólico de la *J. dioica*, obteniendo que para las células C6/36 en placas de 96 pozos (30,000 células/pozo), la concentración citotóxica media fue 101 µg/mL y 60.6 µg/mL a las 48 y 72 horas postratamiento respectivamente.

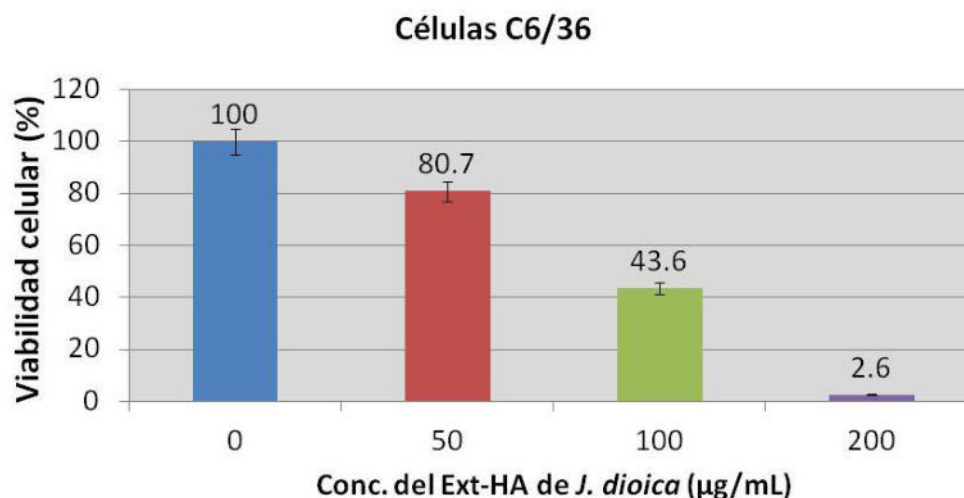


Figura 19. Citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* en células C6/36 evaluadas con azul alamar. La CC₅₀ obtenida para la línea celular C6/36 fue de 101 µg/mL y 60.6 µg/mL a las 48 y 72 horas postratamiento respectivamente. A concentraciones arriba 200 µg/mL, se perdía completamente la viabilidad celular.

Las células C6/36 frente al extracto hidroalcohólico de *J. dioica* fueron sensibles a concentraciones bajas (Figura 19), con 50 µg/mL del extracto hidroalcohólico se registró una viabilidad celular de 80.7 %, mientras que a una concentración de 100 µg/mL del extracto hidroalcohólico se registró una

toxicidad celular de 56.4 % y se registró una toxicidad del 97.4 % con una concentración de 200 µg/mL del extracto hidroalcohólico, y a concentraciones mayores de 200 µg/mL del extracto hidroalcohólico generó la toxicidad del 100 % de las células.

En células Vero, en placas de 96 pozos (15,000 células/pozo) la concentración citotóxica media fue de 401.1 µg/mL y 449.3 µg/mL a las 48 y 72 horas postratamiento respectivamente.

Al evaluar la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* en las células vero (Figura 20), se registró una viabilidad hasta de 98 % a una concentración de 400 µg/mL del extracto hidroalcohólico, y la viabilidad disminuyó a 16.4 % con una concentración de 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico, por la cual se realizó el análisis en el rango de 400 a 500 µg/mL

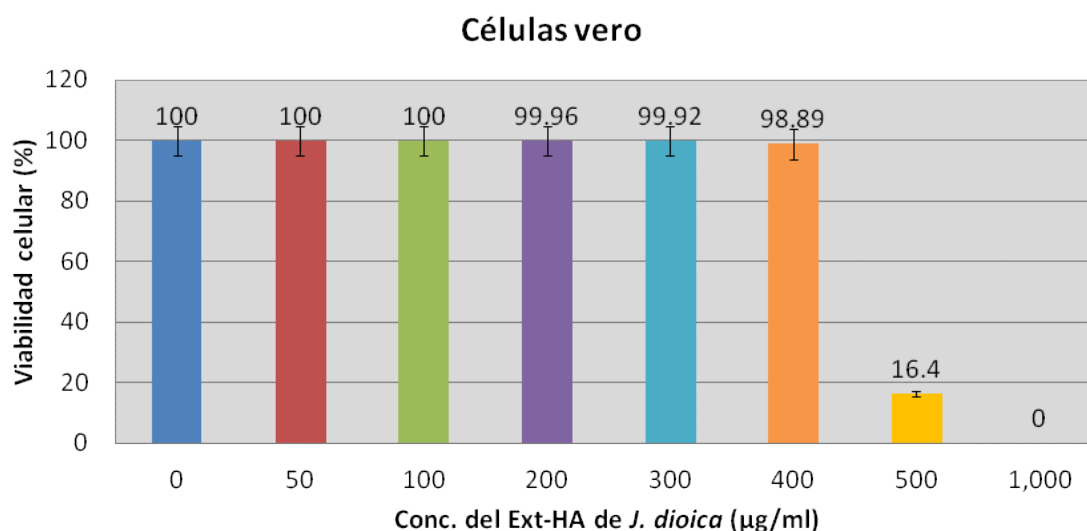


Figura 20. Citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* en células Vero evaluado con azul alamar. La CC_{50} obtenida para la línea celular Vero fue de 401.1 µg/mL y 449.3 µg/mL a las 48 y 72 horas pos-tratamiento respectivamente. A concentraciones arriba 500 µg/mL, se perdía completamente la viabilidad celular.

del extracto hidroalcohólico (Figura 21).

En las células Vero se obtuvo una concentración de 425 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* se obtuvo una viabilidad celular de 64.3 %, y a una concentración de 450 µg/mL se obtuvo una toxicidad del 35.7 %.

mientras que se registró una viabilidad de 49.4 % a una concentración de 450 µg/mL del extracto hidroalcohólico, a la concentración de 475 µg/mL del

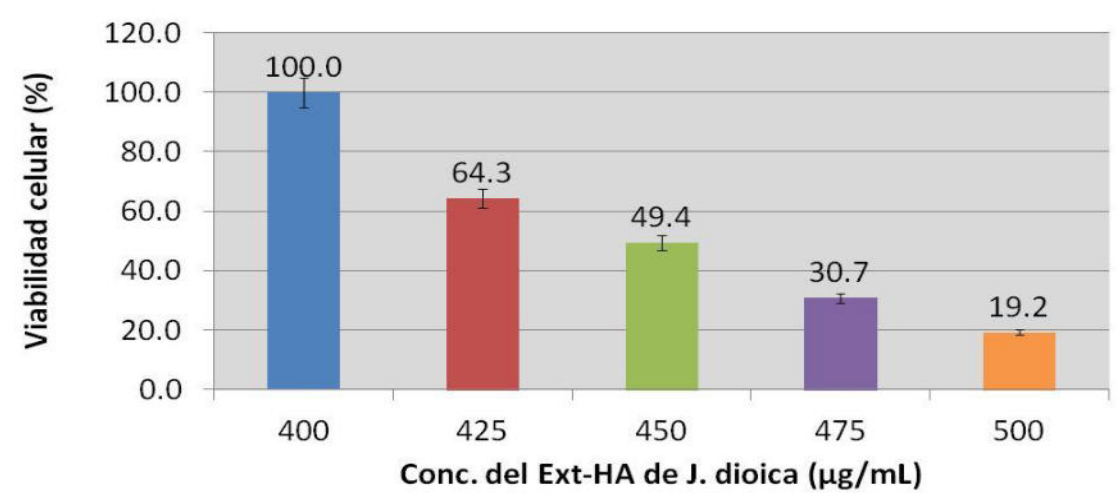


Figura 22. Citotoxicidad en el rango de 400 a 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* en células Vero evaluado con azul alamar. La viabilidad disminuye proporcionalmente a la concentración del extracto hidroalcohólico.

extracto hidroalcohólico la viabilidad obtenida fue de 30.7 %, mientras que a 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico la viabilidad fue de 19.2 %.

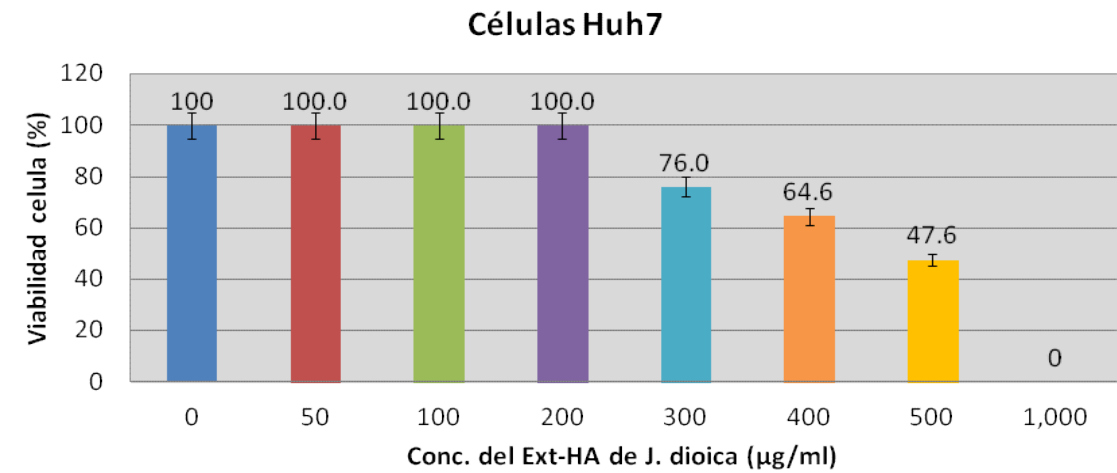


Figura 21. Citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* en células Huh-7 evaluado con azul alamar. La CC₅₀ obtenida para la línea celular Huh-7 fue de 460.1 µg/mL y 482.7 µg/mL a las 48 y 72 horas pos-tratamiento respectivamente. A concentraciones arriba 500 µg/mL, se perdía completamente la viabilidad celular.

Mientras que para las células Huh-7 (15,000 células/pozo), la concentración citotóxica media fue de 460.1 µg/mL y 482.7 µg/mL a las 48 y 72 horas postratamiento respectivamente.

Al evaluar la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* en las células Huh-7, se registró una viabilidad del 100 % con concentraciones de 50, 100 y 200 µg/mL, y la viabilidad disminuyó a 76 % con una concentración de 300 µg/mL, mientras que a una concentración de 400 µg/mL la viabilidad reportada fue de 64.6 % y con 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico se reportó una viabilidad de 47.6 %.

Se calcularon las concentraciones citotóxicas medias en las líneas celulares C6/36, Vero y Huh-7 expuestas al extracto hidroalcohólico de *J. dioica* y se obtuvieron las CC₅₀ resumidas en la siguiente tabla.

Línea celular	48 hpt	72 hpt
C6/36	101 µg/mL	60.6 µg/mL
Vero	401.1 µg/mL	449.3 µg/mL
Huh-7	460.1 µg/mL	482.7 µg/mL

Tabla 14. Valores de CC₅₀ encontrados por línea celular

6.2. AMPLIFICACIÓN Y EVALUACIÓN MOLECULAR DE PARTÍCULAS VIRALES.

Se permitió la infección de células C6/36 en botellas de cultivo con el virus de dengue prototipo 2 de Nueva Guinea (DENV-2 NG) por un máximo de 15 días. Transcurrido el tiempo, se realizó la cosecha con raspador y se alicuotaron en volúmenes de 100 a 200 µL. Posteriormente se almacenaron a - 80 °C hasta su uso. Después se realizó la extracción de ARN total, seguido por

una retrotranscripción y se realizó la evaluación molecular empleando el protocolo de Lanciotti. (Figura 23)

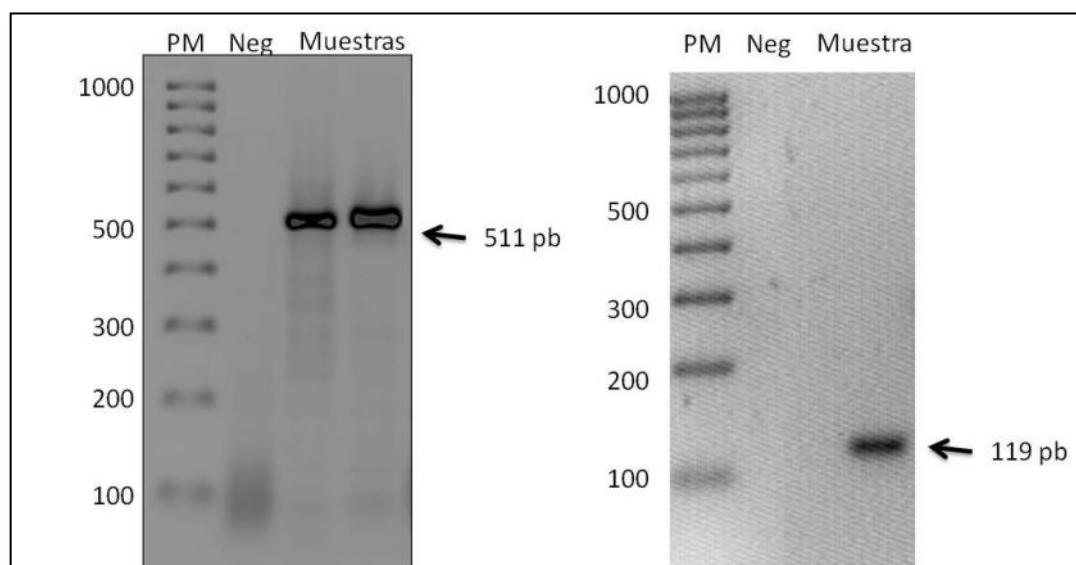


Figura 23. Evaluación molecular del virus de dengue por medio del protocolo de Lanciotti. Evaluación molecular del virus de dengue prototipo 2 de Nueva Guinea, en el gel a la izquierda, se observa una banda de 511 pb correspondiente al virus de dengue, mientras que en el gel de la derecha, se observa la banda de 119 pb correspondiente al virus de dengue serotipo 2.

6.3. EVALUACIÓN LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *J. dioica* CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE.

En células C6/36 en placas de 6 pozos (900,000 células/pozo) infectadas con 10 μ L del DENV-2, las células C6/36 que no estuvieron expuestas al extracto hidroalcohólico, presentaron una morfología normal en monocapa, mientras que las células bajo la infección con el virus de DENV-2 y expuestas a concentraciones de 1, 10, 50 y 100 μ g/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, se observó que la monocapa de células C6/36 se perdía con respecto a las células sanas presentadas a continuación en la Figura 24.

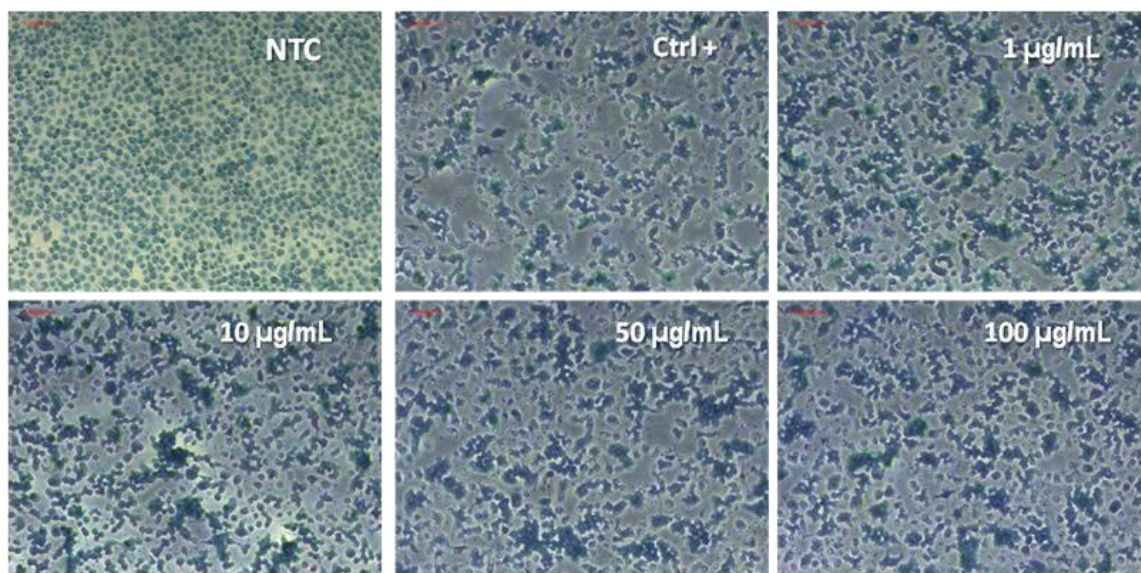


Figura 24. Ensayo de Actividad antiviral en células C6/36 con el Extracto hidroalcohólico. Se observan en las microfotografías a 40x, las diferencias morfológicas de las células en presencia del extracto hidroalcohólico con respecto al control de infección (Ctrl +) y el control sin tratamiento (NTC) y el uso de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico, con tinción Naftol Blue Black.

En las microfotografías de las células C6/36 se evidenció morfológicamente que el tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *J. dioica* se alteró la monocapa celular con respecto al control de células sin infección donde se observó íntegra la monocapa celular, y las células infectadas expuestas al extracto hidroalcohólico de *J. dioica* morfológicamente son parecidas al control de infección, aunque la confluencia pareciera aumentar conforme se aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, pero se observaron efectos citopáticos generados por la infección con el virus de dengue prototipo 2. Por lo cual se consideró que el extracto hidroalcohólico de *J. dioica* es citotóxico contra las células C6/36.

Mientras que, para las células Vero, en un formato en placas de 6 pozos (200,000 células/pozo) infectadas con 10 µL de DENV-2 y en presencia de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* se observó como la monocapa de células Vero se mantuvo con respecto al aumento de la concentración del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*. (Figura 25)

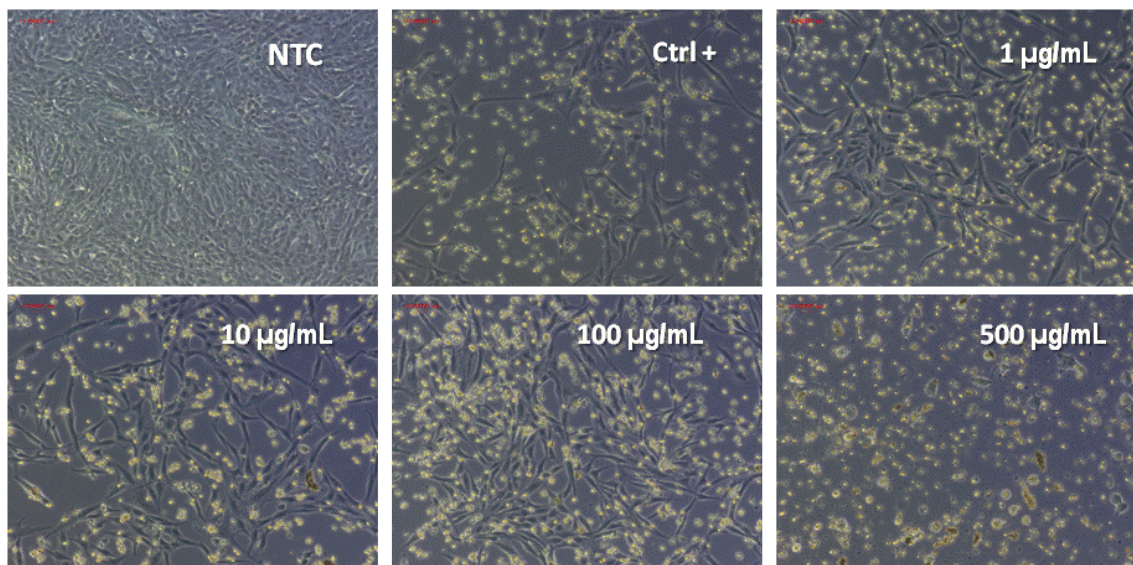


Figura 25 Ensayo de Actividad antiviral en células Vero con el Extracto hidroalcohólico. Se observan en las microfotografías a 40x, las diferencias morfológicas de las células en presencia del extracto hidroalcohólico con respecto al control de infección (Ctrl +) y el control (NTC) y el uso de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico.

En las células Vero infectadas con el virus de dengue y expuestas al extracto hidroalcohólico a una concentración de 1 µg/mL se observaron células adheridas y con morfología habitual sin efectos citopáticos generados por la infección del virus de dengue con referencia a las células sin tratamiento, y con 10 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* aumentó el número de células adheridas conservando la morfología normal sin presencia de efecto citopático, mientras que a una concentración de 100 µg/mL del extracto hidroalcohólico se observaron mayor cantidad de células adheridas con morfología normal compararon con concentraciones menores, y a la concentración de 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico generó la muerte celular por efecto del extracto hidroalcohólico, siendo citotóxica a esta concentración para la línea celular Vero. (Figura 26)

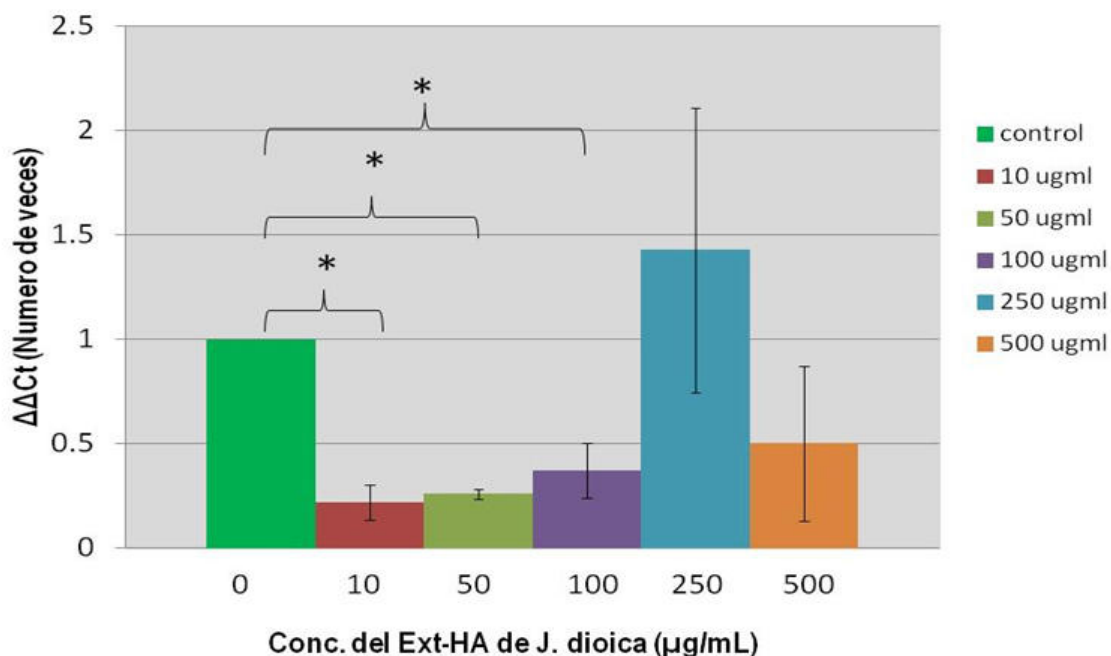


Figura 26. Determinación del número de veces que se expresa el ARN del virus de dengue. A concentraciones de 10, 50 y 100 μg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* disminuye el número de veces que se expresa el ARN del virus de dengue siendo estadísticamente significativo.

6.4. EVALUACIÓN LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *J. dioica* CONTRA EL VIRUS DE HEPATITIS C.

Se realizó el ensayo para determinar la actividad antiviral del extracto hidroalcohólico contra el virus de hepatitis C por medio de la línea celular Huh-7 replicón subgenómico, las cuales expresan constitutivamente proteínas no estructurales del VHC. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* (Figura 27, 28) observando que las células Huh-7 replicón subgenómico mantenían su morfología característica con ausencia y con presencia del extracto hidroalcohólico a concentraciones de 1, 10, 50, 100 μg/mL, mientras que las

células expuestas a concentraciones de 250 y 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico se observó la pérdida de la monocapa celular.

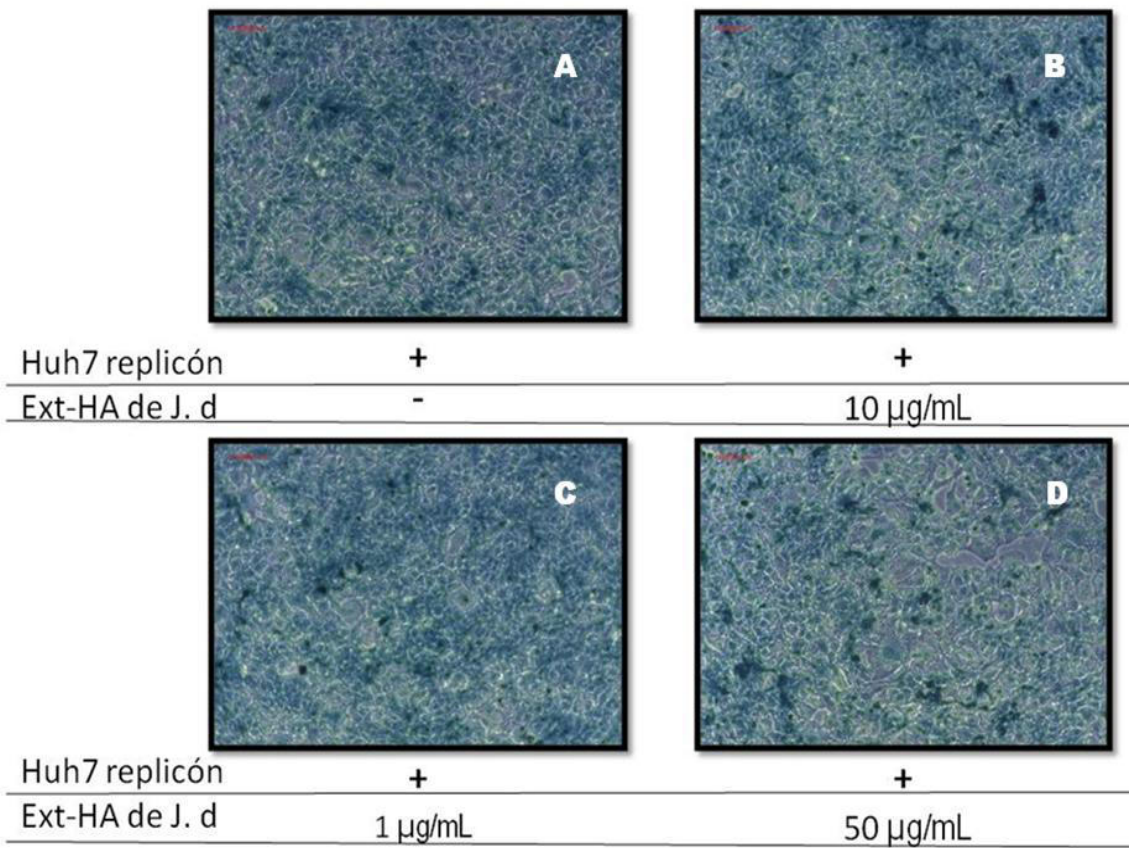


Figura 27. Microfotografías 40x de células Huh-7 replicón subgenómico con ausencia y presencia de del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*. La microfotografía A, son células Huh-7 replicón sin extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, la microfotografía B, corresponde a células Huh-7 replicón expuestas a 1 µg/mL del extracto hidroalcohólico, la microfotografía C son expuestas a 10 µg/mL del extracto hidroalcohólico, y la D fueron expuestas a 50 µg/mL del extracto hidroalcohólico, observando que no existe diferencia en la morfología de la monocapa celular con respecto al control (A).

En las células Huh-7 replicón se observó que mantienen su morfología característica de línea celular y que mantenían la monocapa celular incluso con exposición al extracto hidroalcohólico de *J. dioica* hasta con una concentración no mayor a 100 µg/mL. Mientras que a concentraciones de 250 y 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* se observaron el desprendimiento de las

células a la superficie del pozo, también se observó cambios en la morfología de las células expuestas al extracto hidroalcohólico en comparación con las células sin extracto hidroalcohólico.

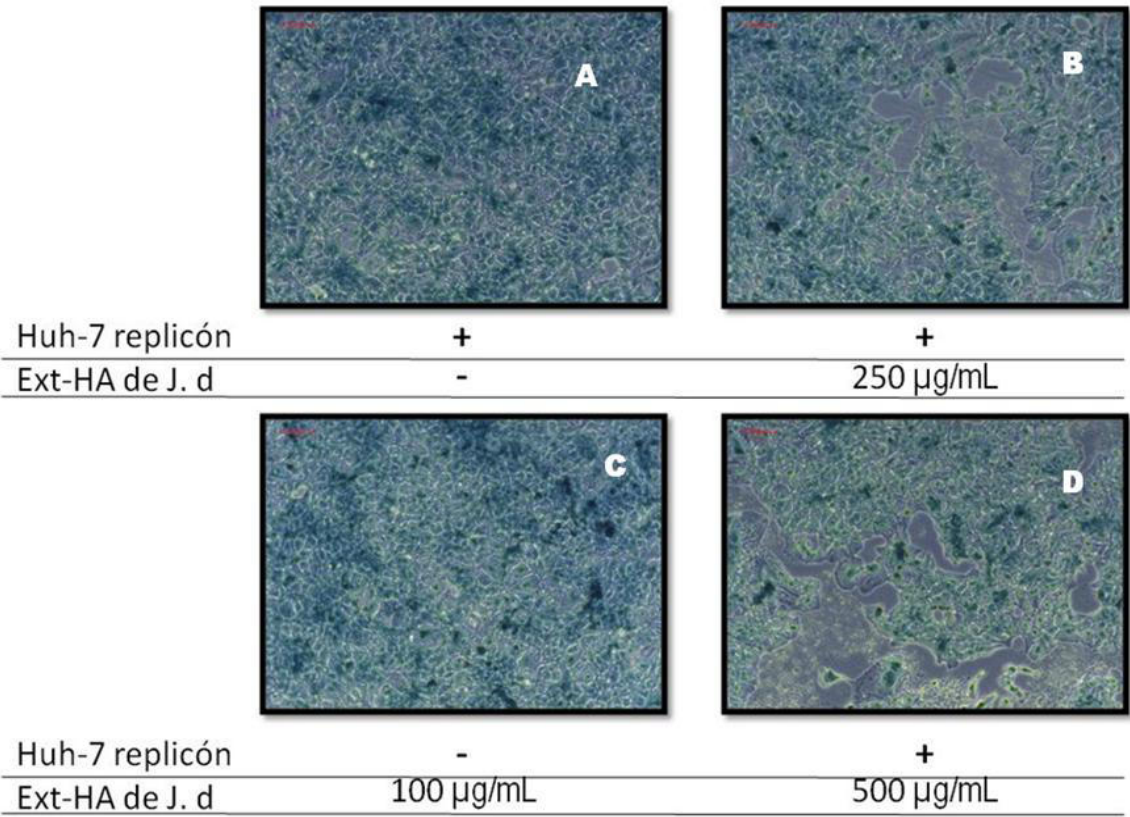


Figura 28. Continuación (40x). La microfotografía A, son células Huh-7 replicón sin extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, la microfotografía B, corresponde a células Huh-7 replicón expuestas a 100 µg/mL del extracto hidroalcohólico y se observa que aún se mantiene la monocapa celular, mientras que en la microfotografía C, que son células Huh-7 replicón expuestas a 250 µg/mL del extracto hidroalcohólico, y la D fueron expuestas a 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico, se observó que no hubo desprendimiento de las células y la morfología e las células eran diferentes con respecto al control (A).

Al realizar el análisis del número de veces que se expresa el ARN del virus de hepatitis C, se observó que a una concentración de 10 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* pareciera incrementar hasta 22 veces la expresión de ARN viral con respecto al control, mientras que a una concentración de 100 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* se registró

un incremento de hasta 53 veces la expresión de ARN viral y de hasta 56 veces a una concentración de 250 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* teniendo como referencia el control sin exposición al extracto hidroalcohólico, lo cual sugiere que el extracto hidroalcohólico de *J. dioica* modula positivamente la expresión de ARN del virus de hepatitis C en la línea celular Huh-7 (figura 29).

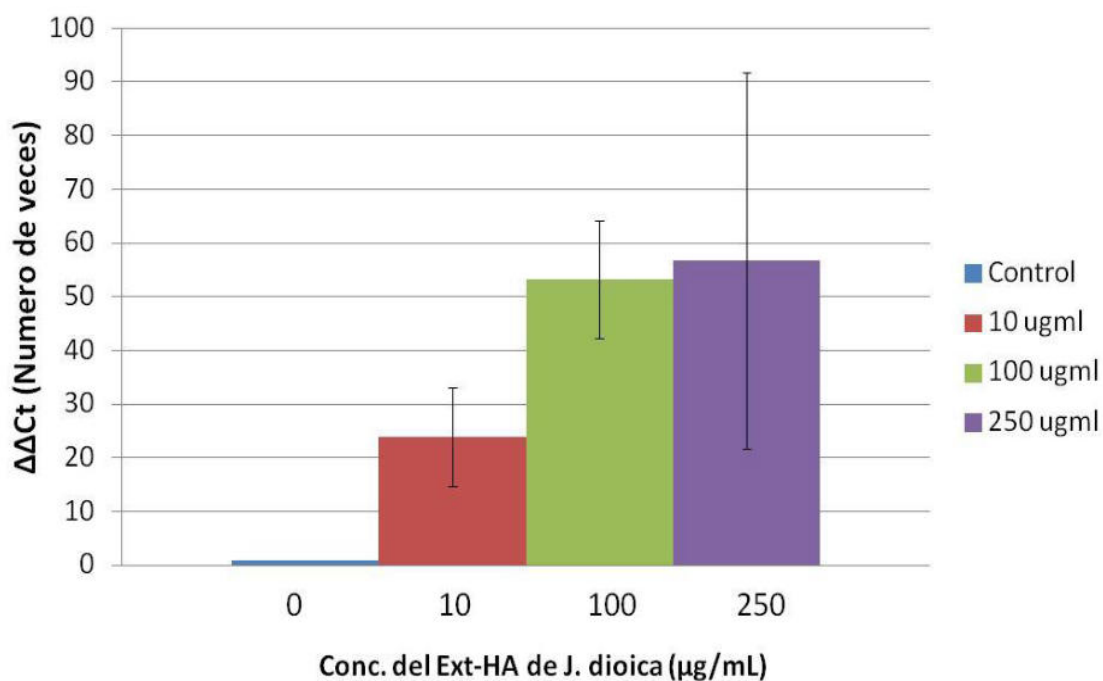
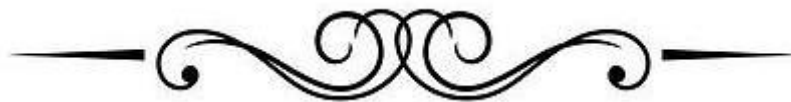


Figura 29. Determinación del número de veces que se expresa el ARN del virus de hepatitis C. Se obtuvo que, a concentraciones de 10, 100 y 250 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* pareciera que aumenta el número de veces que el ARN viral se expresa con respecto al control.





Capítulo 7. DISCUSIÓN

La planta *J. dioica* se utiliza tradicionalmente para tratamiento de infecciones bacterianas, virales, enfermedades bucales e inmunomoduladora. Resultados preliminares obtenidos de nuestro grupo de trabajo, realizados por David Silva Mares (2012) se demostraron que el extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, tiene una citotoxicidad moderada en la línea celular Vero (CC_{50} 644.16 $\mu\text{g/mL}$) y una actividad contra el virus de herpes simplex 1 (VHS-1) y virus de herpes simplex 2 (VHS-2) de $283.85 \pm 12.73 \mu\text{g/mL}$ y $368.11 \pm 60.45 \mu\text{g/mL}$ respectivamente en condiciones *In vitro*. [37]

Por otro lado, el grupo de trabajo de Keivan Zandi (2011) reportaron que el extracto de *Scutellaria baicalensis*, presenta una CC_{50} de 290.9 $\mu\text{g/mL}$ reportando una citotoxicidad moderada en la línea celular Vero. Estos datos se relacionan con los obtenidos en este trabajo, en donde se determinó una citotoxicidad moderada en células Vero con una CC_{50} de 401 $\mu\text{g/mL}$ (± 27.2) de extracto hidroalcohólico de *J. dioica*. [74]

En este trabajo también se determinó la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* en la línea celular Huh-7 que es usada ampliamente como modelo de estudio para el virus de hepatitis C, siendo este el primer reporte de la citotoxicidad usando el extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, en la cual se obtuvo una CC_{50} de 406.1 $\mu\text{g/mL}$ (± 20.8) del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, mostrando una citotoxicidad moderada.

Los datos obtenidos en este trabajo están relacionados con los reportados por el grupo de trabajo de Tutik SriWahyuni (2014) quienes reportaron una $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ del extracto de *Ruta angustifolia* afirmando que la línea celular Huh-7 presenta una moderada a baja citotoxicidad, [53] al

igual que los reportados por el grupo de trabajo de Tariq Javed (2011) quienes reportaron que la línea celular Huh-7 cuentan con una moderada a baja citotoxicidad expuestas al extracto de *Solanum nigrum* reportando una CC_{50} de $<200 \mu\text{g/mL}$ de extracto. Estos datos correlacionan con lo obtenido en este trabajo. [75]

Al mismo tiempo, en este trabajo se realizó la determinación de la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* en la línea celular C6/36, la cual se usa tradicionalmente como método para amplificación viral así reportado por el grupo de trabajo de Brady (2012) donde se emplearon las células C6/36 como modelo de amplificación de Virus de dengue y Chikungunya. [21, 22] Y no existen reportes donde se utilicen esta línea celular como un modelo de estudio para la actividad antiviral, siendo este estudio uno de los primeros reportes del uso de la línea celular C6/36 como modelo de estudio para la actividad antiviral y citotoxicidad usando el extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, en la cual se obtuvo una CC_{50} de $60.6 \mu\text{g/mL}$ (± 14.9) del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, reportando que el extracto hidroalcohólico presenta una alta citotoxicidad en la línea celular C6/36.

En este estudio, los resultados obtenidos de citotoxicidad para la línea celular C6/36 (CC_{50} de $60.6 \mu\text{g/mL}$), fueron menos tolerantes al extracto hidroalcohólico de *J. dioica* que las células Vero (CC_{50} de $401.1 \mu\text{g/mL}$) y la línea celular Huh-7, que resultaron ser las más tolerantes al extracto hidroalcohólico de *J. dioica* (CC_{50} de $460.1 \mu\text{g/mL}$), destacando las diferencias metabólicas entre las líneas celulares sin embargo, en la línea celular C6/36 no se cuenta con reportes del metabolismo en comparación con células Vero y Huh-7, si existen diversos reportes y son ampliamente utilizadas como modelos de estudio en diversos campos de la ciencia.

Con respecto a la actividad antiviral, en este trabajo se observó que el extracto hidroalcohólico de *J. dioica* parece modular negativamente el efecto citopático y el nivel de ARN viral en células Vero infectadas con el virus de dengue prototipo 2 de Nueva Guinea; la cual se reportó una disminución en el

número de veces en la expresión de ARN viral de hasta un 80 %, alcanzada a una concentración de 10 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, mientras que a una concentración de 50 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* se reduce hasta un 68 %, mientras que con una concentración de 100 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* se reduce a un 60 % de inhibición con respecto al control (células no expuestas al extracto hidroalcohólico de *J. dioica*) las cuales son estadísticamente significativas. ($p < 0.05$)

En el grupo de trabajo de Keivan Zandi (2014) reportaron que el extracto de *Scutellaria baicalensis*, presenta inhibición del 98 % con una concentración de 50 µg/mL del extracto, mientras que, en este trabajo, se alcanzó a inhibir hasta un 80 % con una concentración de 10 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*. [74] Por otro lado, el grupo de trabajo de Klawikkan (2011) reportaron una inhibición del 53.5 % a una concentración de 12.5 µg/mL del extracto de *Piper retrofractum* y una inhibición de 56.1 % a una concentración de 12.5 µg/mL del extracto de *Rhizophora apiculata*, lo cual nos permite considerar la posible actividad antiviral del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* contra el virus de dengue prototipo 2. [76]

Mientras que al evaluar la actividad del extracto hidroalcohólico frente al VHC, en este trabajo utilizando la línea celular Huh-7 replicón subgenómico, los datos obtenidos se debe al metabolismo de la línea celular, aunque es el primer reporte de *J. dioica* contra VHC, existen otros grupos de trabajos, tales como el grupo de Tutik SriWajyuni (2014) quienes demostraron el extracto de *Ruta angustifolia* presentan una actividad contra el VHC, obteniendo que a una concentración de 30 µg/mL del extracto de *Ruta angustifolia* alcanzaba una inhibición del 60 %. Y de la cual se aislaron 2 componentes que presentan la actividad, reportadas que Chalepina y Pseudane IX. [55]

En el presente trabajo los tratamientos con el extracto se usaron posterior a la infección con los virus, para evaluar si el extracto hidroalcohólico de *J. dioica* disminuía la replicación viral. Obteniendo como resultados la

disminución de la concentración de ARN del DENV-2 en células Vero, mientras que no disminuyó la concentración de ARN del VHC en el modelo usando Huh-7 replicón subgenómico. Autores como Navin Khanna, et al. (2015) realizaron un abordaje diferente al nuestro, ellos determinaron si el extracto tenía actividad protectora, y obtuvieron que el extracto de *Cissampelos pareira* presenta actividad contra los 4 serotipos de dengue posiblemente evitando la penetración del virus de dengue. Por lo cual sería un área por explorar con el extracto hidroalcohólico de *J. dioica*. [77]

En el presente trabajo se observó que la línea celular C6/36, es la más sensible a la presencia del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, presentando una CC_{50} de 101 $\mu\text{g/mL}$ y 60.6 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 y 72 horas postratamiento, algo que se correlaciona con lo reportado con Maureen Leyva y et. al (2017) quienes reportaron que algunas especies del género *Jatropha* presentan actividad insecticida, como lo son las especies de *Jatropha mollissima* y *Jatropha isabelli*, que con la obtención de extractos a partir de la raíz demostraron su actividad insecticida. [78]

Así mismo en lo reportado por D. Natarajan y et. Al (2019), quienes a partir de extracto de *Pavetta tomentosa* demostraron que presentaban actividad insecticida contra diferentes estadios de *A. aegypti* presentando CL_{50} a las 48 horas postratamiento de la extracción por acetona de 9.122 $\mu\text{g/mL}$. Y también determinaron la CC_{50} en línea celular C6/36 con el extracto por acetona obteniendo 125 $\mu\text{g/mL}$, por la cual ellos siguieron el extracto por acetona de *Pavetta tomentosa* tiene potencial para la prevención del virus del dengue y su vector. [79] Por lo cual, estos resultados servirían como pautas para demostrar que el extracto hidroalcohólico de *J. dioica* pueda presentar una potencial actividad insecticida.

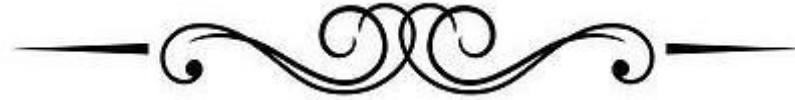




Capítulo 8. CONCLUSIONES.

1. Se evaluó la citotoxicidad del extracto hidroalcohólico de la *J. dioica* en líneas celulares C6/36, Vero y Huh-7 determinándose CC50 de 60.6, 401 y 460.1 µg/mL respectivamente.
2. El extracto hidroalcohólico de *J. dioica* disminuyó el efecto citopático y redujo los niveles de ARN viral medidos por q-PCR, en la línea celular Vero infectada con DENV-2 NG.
3. El extracto hidroalcohólico de *J. dioica* no redujo los niveles de ARN viral medidos por q-PCR, en la línea celular Huh-7 replicón subgenómico que expresa constitutivamente proteínas no estructurales de VHC.





Capítulo 9. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS, Enfermedades Infecciosas. 2020. Disponible es: http://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/. Pagina visitada en enero 2021.
2. OMS, Hepatitis C. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. Pagina visitada en enero 2021.
3. Informe Mundial sobre la Hepatitis 2017. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2017. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>. Pagina visitada en enero 2021.
4. OPS/OMS, Alienta a los países de las Américas a actuar para reducir las muertes por hepatitis y mejorar la prevención y el tratamiento 2020. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12334:opsoms-alienta-paises-americas-reducir-muertes-por-hepatitis&Itemid=1926&lang=es pagina visitada en enero 2021.
5. Boletín, Programa nacional de eliminación de la hepatitis C. Gobierno de México, Volumen 1, No. 1, julio 2020. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/569998/Boletin_VHC_V_P_DIO_ATR_13082020DPPS.pdf. Pagina visitada en enero 2021.
6. Valdespino JL, Conde-González CJ, Olaiz-Fernández G, Palma O, Kershenobich D, Sepúlveda J. (2007) Seroprevalencia de la hepatitis C en adultos de México: ¿un problema de salud pública emergente? Salud Pública Mex; 49 supl 3:S395-S403.
7. Burguete-García AI, Conde-González CJ, Jiménez-Méndez R, Juárez-Díaz Y, Meda-Monzón E, Torres-Poveda K, et al. (2011) Hepatitis C

- seroprevalence and correlation between viral load and viral genotype among primary care clients in México. *Salud Pública Mex*; 53 Suppl 1: S7-12.
8. Boletín, Programa nacional de eliminación de la hepatitis C. Gobierno de México, Volumen 1, No. 3, diciembre 2020. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/603406/Boletín_VHC-Vol_3.pdf. Pagina visitada en enero 2021.
 9. Lozano-Mérida, J. A. (2004). Hepatitis C crónica: vías de transmisión, Diagnóstico, clínica y tratamiento. *OFFARM. VOL 23 NÚM 3 MARZO 2004*.
 10. Baltimore D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 35 (3): 235-41. [PMC 378387](#). [PMID 4329869](#).
 11. George Koutsoudakis, Xavier Forns y Sofía Pérez-del-Pulgar (2013). Biología molecular aplicada del virus de la hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol*. 2013;36(4):280---293.
 12. ExPASy. Hepacivirus: VHC. 2016; Disponible en: [https://viralzone.expasy.org/37?outline=all by species](https://viralzone.expasy.org/37?outline=all%20by%20species). Pagina visitada en enero 2021.
 13. McLauchlan J. (2000) Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J Viral Hepat*. 2000; 7:2-14.
 14. Darius Moradpour, et al.(2007). Replication of hepatitis C virus. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY*, 2007. 5: p. 453-463.
 15. J. Zhong, P. Gastaminza, G. Cheng, S. Kapadia, T. Kato, D.R. Burton, et al. (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 pp. 9294-9299 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0503596102>.
 16. B.D. Lindenbach, M.J. Evans, A.J. Syder, B. Wolk, T.L. Tellinghuisen, C.C. Liu, et al. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 309, pp. 623-626 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1114016>.
 17. C.T. Jones, C.L. Murray, D.K. Eastman, J. Tassello, C.M. Rice. (2007) Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus. *J Virol*, 81, pp. 8374-8383 <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00690-07>.
 18. Benga WJ, Krieger SE, Dimitrova M, Zeisel MB, Parnot M, Lupberger J, et al. (2010). Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5 A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology*; 51:43-53.

- 19.OMS (2020). Organización Mundial De La Salud. Dengue, Nota descriptiva agosto de 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Pagina visitada en enero 2021.
- 20.San Martin JL, et al. (2010). The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 82(1): 128-135.
- 21.Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et.al. (2013) The global distribution and burden of dengue. Nature; 496:504-507.
- 22.Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG et al. (2012) Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:e1760. doi:10.1371/journal.pntd.0001760.
- 23.CDC, (2020) Centro para el Control y la Prevencion de Enfermedades, Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas Zoonóticas y Emergentes. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/es/areaswithrisk/around-the-world.html>. Pagina visitada en enero 2021.
- 24.ExPASy (2020). Dengue: DENV. Disponible en: http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/24.html. Pagina visitada en enero 2021.
- 25.CENAPRECE (2016). Enfermedades Transmitidas por Vectores: Dengue. Pagina visitada en enero 2021 Disponible en: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue.html>.
- 26.PLISA Plataforma de Información en Salud para las Américas (2021) Pagina visitada en enero 2021. Disponible en: <https://www.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9-dengue-pais-ano.html>.
- 27.DGE (2020). Panorama Epidemiológico de dengue, 2020. Disponible en: [Pano dengue SE52 2020.pdf \(www.gob.mx\)](Pano_dengue_SE52_2020.pdf) Pagina visitada en enero 2021.
- 28.Arellanos Soto, D. (2015). Evaluación de los perfiles de respuesta a interferón inducidos como respuesta a la infección con el virus del dengue. Facultad de Medicina. Monterrey, Universidad Autónoma de Nuevo León. Doctorado en Ciencias: 155.
- 29.Zhang, W. e. a. (2014). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. Nat Struct Biol 10(11): 907-912.

30. Suchetana Mukhopadhyay, et al. (2005). "A STRUCTURAL PERSPECTIVE OF THE FLAVIVIRUS LIFE CYCLE." NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY 3: 13-22.
31. Miller Sven, et al. (2008). "Molecular aspects of Dengue virus replication." Future Medicine 3(2): 155-165.
32. Clyde K, Kyle JL, Harris E. (2006) Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. J Virol, 80(23): 11418-11431.
33. Seema, Jain SK. (2005) Molecular mechanism of pathogenesis of dengue virus: Entry and fusion with target cell. Indian J Clin Biochem, 20(2): 92- 103.
34. Chen Y, Ren RW, Liu JW. (2014) "Research progress in the structure and function of dengue virus non-structural 1 protein". Bing Du Xue Bao. Nov;30(6):683-8.
35. Karam AM., S. T. (1990). "Simplified Plaque Reduction Assay for Antiviral Agents from Plants. Demonstration of Frequent Occurrence of Antiviral Activity in Higher Plants.." Journal of Natural Products. 53(2): 340-344.
36. López Serrano Miriam (2012) Manual de plantas medicinales para guinea ecuatorial; Fundación de Religiosos para la salud (FRS)
37. Silva Mares, D.A. (2013). Aislamiento biodirigido de compuestos con actividad antiviral contra VHS-1 y VHS-2 a partir de plantas del noreste de México. Universidad Autónoma De Nuevo León Facultad De Medicina.
38. Treviño L, T. I., Cárdenas B, Vallarta M. (2006). "Análisis de susceptibilidad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos aislados de pacientes con periodontitis, al extracto etanólico del tallo de *Jatropha dioica*." Revista Salud Pública y Nutrición 4(6).
39. Niedermeyer, T. (2005). "Antiviral Terpenoid Constituents of *Ganoderma pfeifferi*." J. Nat. Prod. 68: 1728-1731.
40. Hoogesteger C. (1988). Uso de plantas medicinales. Pax México D.F. 5, 145148.
41. Eduardo Orrego Escobar (2013) Plantas con actividad antiviral. Medwave; 13(10): e5854 doi: 10.5867/medwave.2013.10.5854.
42. NCCLS. (2004). Antiviral Susceptibility Testing: Herpes Simplex Virus by Plaque Reduction Assay; Approved Standard. NCCLS document M33-A Pennsylvania. 19087-1898.
43. Danaher RJ, Wang C, Dai J, Mumper RJ, Miller CS. (2011) Antiviral effects of blackberry extract against herpes simplex virus type 1. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. Sep;112(3): e31-5.
44. Denizot F, Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved

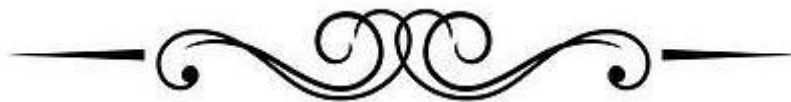
- sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 89, (2), 271-277.
45. Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S. (2012) Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. *BMC Complement Altern Med*. Nov 9; 12:214.
46. Lee SH, Tang YQ, Rathkrishnan A, Wang SM, Ong KC, Manikam R, et al. (2013) Effects of cocktail of four local Malaysian medicinal plants (*Phyllanthus* spp.) against dengue virus 2. *BMC Complement Altern Med*. Jul 26;13(1):192.
47. A. Deethae; Y. Peerapornpisal; J. Pekkoh; P. Sangthong; Y. Tragoolpua. (2018) Inhibitory effect of *Spirogyra* spp. algal extracts against herpes simplex virus type 1 and 2 infection. *J Appl Microbiol*. Jun;124(6):1441-1453. doi: 10.1111/jam.13729. Epub 2018 Mar 13.
48. Ludmila Yarmolinsky, Michele Zaccai, Shimon Ben-Shabat, and Mahmoud Huleihel. (2010) Anti-Herpetic Activity of *Callissia fragrans* and *Simmondsia chinensis* Leaf Extracts In Vitro. *Open Virol J*. 4: 57–62. doi: 10.2174/1874357901004010057.
49. Xi-Ping Z, Man-Li Z, Xiao-Huo S, Chang-Hong H, Yu-Cheng G, Qing-Wen S. (2009). Chemical. Constituents of the Plants from Genus *Jatropha*. *Chemistry & Biodiversity*. 6, (12), 2166-2183.
50. Meneses, R. (2009). "Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y de la fiebre amarilla." *Salud UIS* 41: 236-243.
51. Latifah, S. (2013). "Potential anti-dengue medicinal plants: a review." *J Nat Med* 67: 677-689.
52. Róbson Teixeira, S. O. (2014). "Natural products as source of potential dengue antivirals." *Molecules* 19: 8151-8176.
53. Tutik Sri Wajyuni, H. H., et. Al. (2014). "Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves." *Fitoterapia* 99: 276-283.
54. Usman A. Ashfaq, S. I. (2014). "Medicinal plants against hepatitis C virus." *World Journal of Gastroenterology* 20(11): 2941-2947.
55. Wang YJ, Pan KL, Hsieh TC, Chang TY, Lin WH, Hsu JT (2011). Diosgenin, a plant-derived sapogenin, exhibits antiviral activity in vitro against hepatitis C virus. *J Nat Prod* 2011; 74: 580-584 PMID: 21391660 DOI: 10.1021/np100578u.
56. Polyak SJ, Morishima C, Shuhart MC, Wang CC, Liu Y, Lee DY. (2007). Inhibition of T-cell inflammatory cytokines, hepatocyte NF-kappaB signaling, and HCV infection by standardized Silymarin. *Gastroenterology* 2007; 132: 1925-1936 [PMID: 17484885].

57. Glass P, Miller M, Short B. (1989). Morbidity for survivors of extra-corporeal membrane oxygenation: neurodevelopmental outcome at 1 year of age. *Pediatrics* 1989; 83: 72-78 PMID: 2909978 DOI: 10.1002/hep.23587.
58. Zhang H, Rothwangl K, Mesecar AD, Sabahi A, Rong L, Fong HH. (2009). Lamiridosins, hepatitis C virus entry inhibitors from *Lamium album*. *J Nat Prod* 2009; 72: 2158-2162 PMID: 19904996 DOI: 10.1021/np900549e.
59. McGarvey P, Helling RB, Lee JY, Engelke DR, el-Gewely MR. (1988). Initiation of rrn transcription in chloroplasts of *Euglena gracilis* bacillaris. *Curr Genet* 1988; 14: 493-500 PMID: 2852069 DOI: 10.4103/0250-474X.40339.
60. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML. (2008). Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology* 2008; 47: 1437-1445 PMID: 18393287 DOI: 10.1002/hep.22197.
61. Cheung R, Dickins J, Nicholson PW, Thomas AS, Smith HH, Larson HE, Deshmukh AA, Dobbs RJ, Dobbs SM. (1988). Compliance with anti-tuberculous therapy: a field trial of a pill-box with a concealed electronic recording device. *Eur J Clin Pharmacol* 1988; 35: 401-407 PMID: 3197749 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.02.011.
62. Ciesek S, von Hahn T, Colpitts CC, Schang LM, Friesland M, SteinMann J, Manns MP, Ott M, Wedemeyer H, Meuleman P, Pietschmann T, SteinMann E. (2011). The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* 2011; 54: 1947-1955 PMID: 21837753 DOI: 10.1002/hep.24610.
63. Fukazawa H, Suzuki T, Wakita T, Murakami Y. (2012). A cell-based, microplate colorimetric screen identifies 7,8-benzoflavone and green tea gallate catechins as inhibitors of the hepatitis C virus. *Biol Pharm Bull* 2012; 35: 1320-1327 PMID: 22863932.
64. Gonzalez O, Fontanes V, Raychaudhuri S, Loo R, Loo J, Arumugaswami V, Sun R, Dasgupta A, French SW. (2009). The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. *Hepatology* 2009; 50: 1756-1764 [PMID: 19839005].
65. Bachmetov L, Gal-Tanamy M, Shapira A, Vorobeychik M, Giterman-Galam T, Sathiyamoorthy P, Golan-Goldhirsh A, Benhar I, Tur-Kaspa R, Zemel R. (2012). Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity. *J Viral Hepat* 2012; 19: e81-e88; PMID: 22239530 DOI: 10.1111/j.1365-2893.2011.01507.x.

66. Vuillard, L. (1995). "Non-detergent sulphobetaines: a new class of mild solubilization agents for protein purification." *Biochemical Journal* 305(1): 337-343.
67. Silva-Mares, D. et. Al. (2013) Plants from Northeast Mexico with Anti-HSV Activity. *Natural Product Communications* Vol. 8 (3). 297 – 298.
68. Silva-Mares, D. et. Al. (2015) ESTUDIO DE PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO CON ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA. Disponible es: <https://www.researchgate.net/publication/277331050>.
69. Silva-Mares, D. et. Al. (2016) ESTUDIO DE PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO CON ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA Y CITOTÓXICA. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/303679340>.
70. Ferrel-Hernández, D., y Silva-Mares, D. et. Al. (2018) Evaluación de las actividades Virucida y Protectora de Rioloatriona en la vía de infección por VHS-1. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/326020432>.
71. Salas-Villalobos, T. y et. Al. (2013) EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y NO-ESTRUCTURALES DEL VHC EN LA EXPRESIÓN DE COX-2. Tesis de maestría de la facultad de medicina. UANL, Monterrey, N. L.
72. Lozano-Sepúlveda, S. A., et al. (2016) EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA S-ADENOSIL METIONINA (SAM) Y SU MECANISMO DE ACCIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL VHC. Tesis de doctorado de la facultad de medicina. UANL, Monterrey, N. L.
73. CDC. (2013) Ensayo de RT-PCR en tiempo real para DENV-1-4 de los CDC. 05-01-2013. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/resources/rt-pcr/cdcpackageinsert-spanish.pdf>.
74. Ehsan Moghaddam, Boon-Teong Teoh, Sing-Sin Sam, Rafidah Lani, Pouya Hassandarvish, Zamri Chik, Andrew Yueh, Sazaly Abubakar & Keivan Zandi. (2014) Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. *SCIENTIFIC REPORTS* | 4 : 5452 | DOI: 10.1038/srep05452.
75. Tariq Javed, Usman Ali Ashfaq, Sana Riaz, Sidra Rehman, Sheikh Riazuddin. (2011) In-vitro antiviral activity of *Solanum nigrum* against Hepatitis C Virus. *Virology Journal* 2011, 8:26 <http://www.virologyj.com/content/8/1/26>

76. Klawikkan N, Nukoolkarn V, et al. (2011) Effect of Thai medicinal plant extracts against Dengue virus in vitro. MU JPharm 38(1–2):13–18.
77. Navin Khanna, et al. (2015) Cissapelos pareir Linn: Natural Source of Potent Antiviral Activity against All Four Dengue Virus Serotypes. PLOS Negle Trop Dis.
78. Maureen Leyva, Leidys French and et. Al. (2017) Plantas con actividad insecticida: una alternativa natural contra mosquitos. Estado actual de la temática en la región de las Americas. Rev Biomed 2017; 28:137-178.
79. T. Pratheeba; V. Taranath DVR Sai Gopal and D. Natarajan. (2019) Antidengue potential of leaf extracts of *Pavetta tomentosa* and *Tarenna asiatica* (Rubiaceae) against dengue virus and its vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Heliyon 5:e027322. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019>.
80. Ramírez-Moreno, A. (2020) *Jatropha dioica*, an Aztec plant with promising pharmacological properties: A systematic review. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. Vol. 14(6), pp. 169-178, July, 2020 DOI: 10.5897/AJPP2020.5147 Article Number: E7D9C0F64107 ISSN: 1996-0816.





Capítulo 10. ANEXOS

10.1. TÉCNICAS Y PROTOCOLOS

CULTIVO CELULAR

1. SUPLEMENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Mechero de Bunsen.
- Pipetor.

I. Medio Leibovitz (L-15).

Reactivos

- Medio de cultivo Leibovitz (L-15) con L-Glutamina. 500 mL In vitro S.A. cat. ME-040.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. HyClone. Cat. sh30396.03.
- Solución de antibiótico-antimicótico (100X) Penicilina-Estreptomicina
- Anfotericina B, 100 mL, In vitro, S.A. Cat. A-07.
- Solución de aminoácidos no esenciales (100X), para medio mínimo esencial de Eagle, 100 mL, In vitro S.A. Cat. SR-05.

- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.

Protocolo

1. Medio al 10% SBF para mantenimiento de células C6/36. Para suplementar 500 mL de medio L-15 al 10%, se requieren 50 mL de suero bovino fetal inactivado, 5.5 mL de solución antibiótico/antimicótico (100X) y 5.5 mL de solución de aminoácidos no esenciales (concentración final 1X). El medio al 10% es el que se debe utilizar para subcultivar.
2. Medio al 2% SBF para infección viral de células C6/36. El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% con respecto al SBF. A 500 mL de medio L-15 se añaden 10 mL SBF + 5 mL de antibiótico/antimicótico + 5 mL de aminoácidos no esenciales.

Observaciones

- Es fundamental usar un suero bovino fetal compatible con las células C6/36 (HyClone), Gibco e Invitrogen parecen no dar buenos resultados, observándose como las células comienzan a decaer después del tercer pasaje.
- El volumen de bicarbonato necesario para alcalinizar el medio es empírico dependiendo del lote adquirido: el medio debe tornarse color rojo grosella para poder ser utilizado. En general para 500 mL de medio se añaden 3 mL de solución de bicarbonato y lograr un pH de 7.2.
- El medio de cultivo puede irse alcalinizando con el abrir y cerrar continuo de los frascos que lo contienen. Para acidificar el medio se pueden emplear unas gotas de HCl 1M esterilizado por filtración con una

membrana de 0.22. Mantener el ácido y el bicarbonato en refrigeración a 4°C.

II. Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced-DMEM).

Reactivos

- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced DMEM). 500 mL. GIBCO. Cat. 12491015.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. GIBCO. Cat. 16000-044.
- Solución de antibiótico penicilina/estreptomicina 100X. 100 mL. GIBCO. Cat. 15070-063.
- Aminoácidos no esenciales. 10 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 11140-050.
- L-Glutamina. 200 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 25030081.

Protocolo

- a) Medio con 2% de SBF para mantenimiento de células Huh-7. Para suplementar 500 mL de medio Advanced DMEM al 2% se requieren 10 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de aminoácidos no esenciales (100X), 5 mL de solución de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de L- glutamina (100X).
- b) Medio con 1% de SBF para infección viral de células Huh-7. Para suplementar 500 mL de medio Advanced DMEM al 1% se requiere 1 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de aminoácidos no esenciales (100X), 5 mL de solución de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de L- glutamina (100X).

10.2. MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.

Fundamento.

El subcultivo provee la oportunidad para expandir la población celular total, aplicar presión selectiva empleando en el medio un agente de selección y permitir la generación de cultivos réplica para caracterización, experimentación, preservación y congelación. Cuando el cultivo se encuentra aproximadamente al 90% de confluencia, es necesario realizar su subcultivo para asegurar la formación de monocapas y evitar los cúmulos celulares. Los pasajes permiten mantener limpio el medio de cultivo y evitar la aglomeración de células, permitiendo que cada unidad de la monocapa reciba la misma concentración de nutrientes y se encuentre expuesta a las mismas condiciones que las demás células.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 13-678-11C.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm².
 - a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
 - b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.
- Botellas para cultivo celular de 75 cm².
 - a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641.
 - b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430199.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Pipeta pasteur. Marca Corning. Cat. 101001440.

Reactivos

- Medio de cultivo

a) Medio L-15 (Leibovitz). Marca In vitro SA, cat. ME-040. Suplementado al 5% con suero bovino fetal.

b) Advanced DMEM. Marca GIBCO cat. 12491015. Suplementado al 2% con suero bovino fetal.

- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.
- Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL. Marca GIBCO cat. 15050057.
- Aminoácidos no esenciales 100X. Marca GIBCO cat. 11140-050.
- L-glutamina 100X. Marca GIBCO cat. 25030081.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de vacío.
- Centrífuga.
- Incubadora con tanque de CO₂.
- Incubadora sin tanque de CO₂.
- Bomba de presión y vacío.

I. Protocolo para células C6/36

1. Golpear botella confluyente para eliminar células C6/36 que no se encuentren adheridas. Si no se va a dividir el cultivo es innecesario golpear la botella.
2. Decantar medio de cultivo.
3. Añadir medio nuevo a la botella (L-15, 10% SBF. 25 cm²: 5 mL medio, 75 cm², 10 mL medio).
4. Golpear botella con medio nuevo. De ser necesario, realizar raspado con gendarme para desprender la mayoría de las células. Hacer dilución 1:10 en botellas nuevas o dependiendo de la necesidad de botellas a sembrar.

5. Ajustar volumen final en las botellas subcultivadas (25 cm²: 5 mL medio, 75 cm², 10 mL medio).
6. Al cultivo inicial añadir medio fresco y continuar creciendo.
7. Crecer a temperatura ambiente (23-24°C) con la tapa cerrada.
8. La botella sembrada alcanza confluencia entre 5 a 7 días, lo que permite hacer los subcultivos semanalmente.

Observaciones

- El medio debe estar al 10% con SBF para que las células crezcan.
- El número de pases es indistinto, se puede continuar cultivando a partir de la botella inicial. No tirar botellas a menos que sea necesario.
Si se desea que las células crezcan más rápido, golpear vigorosamente la botella de cultivo.
- Si el pH del medio parece estar ácido (color amarillo) y la botella todavía no está confluyente, se puede alcalinizar a rojo de nuevo añadiendo unos cuantos microlitros de bicarbonato de sodio al 75% estéril.
- Las células C6/36 prefieren el medio ácido cuando se encuentran en división, por lo que no afecta tanto el vire de coloración del medio en comparación con otras líneas celulares.

II. Protocolo para células Huh-7.

1. Retirar el medio de cultivo viejo por aspiración.
2. Lavar las células con una alícuota de PBS estéril 1X. por cada 25 cm² de superficie se debe emplear 1 mL de buffer de lavado. Realizar movimientos circulares para permitir que la solución entre en contacto con todas las unidades de la monocapa y pueda remover la mayor cantidad posible de detrito celular.
3. Retirar el PBS 1X por aspiración.

4. Añadir tripsina. Las células en una botella de 25 cm² se levantan con 1 mL de tripsina. Las de una botella de 75 cm² se levantan con 3 mL.
5. Incubar a 37°C durante 5 minutos. Procurar no exceder el tiempo para que la enzima no comience a degradar la membrana celular.
6. Neutralizar la actividad de la tripsina adicionando un volumen 1:1 de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal.
7. Recolectar la suspensión celular en un tubo Falcón de 15 mL.
8. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Cuidadosamente retirar el medio de cultivo utilizado para neutralizar la tripsina. Se puede dejar un poco de volumen para no romper el botón celular.
10. Añadir medio de cultivo nuevo dependiendo del tamaño del botón celular obtenido. Generalmente el botón obtenido a partir de una botella semiconfluente de 25 cm² requiere ser resuspendido en 3 mL de medio nuevo; mientras que un botón celular proveniente de una botella semiconfluente de 75 cm² se puede resuspender en 4 a 5 mL de medio.
11. Resuspender completamente con ayuda de una pipeta de 2 mL (o con una puntilla de 1000 µL) el botón celular en el medio nuevo hasta observar que no hay cúmulos flotando.
12. Preparar la botella de cultivo a sembrar con la cantidad de medio nuevo correspondiente y depositar en ella el volumen deseado de la suspensión celular.
13. Incubar a 37 °C con 5% CO₂.

Observaciones

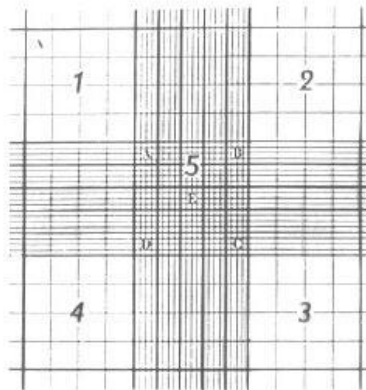
- Las células no deben exponerse más de 10 minutos al PBS 1X y no más de 5 minutos a la tripsina.

- La suspensión celular obtenida al neutralizar la tripsina con medio de cultivo suplementado, se centrifuga para asegurar un nivel de compactación homogéneo. Cuando se disgrega de forma correcta se evita la formación de cúmulos celulares.
- Es recomendable flamear las bocas y las tapas de las botellas de cultivo después de abrir y antes de cerrar para evitar contaminación de su contenido.
- Si se emplean micropipetas automáticas, jamás permitir la entrada del vástago a las botellas, ya sean de cultivo celular o las correspondientes a los reactivos en uso.

10.3. RECUENTO CELULAR

Fundamento

La técnica de recuento celular utilizando el hemocitómetro o cámara de Neubauer fue diseñada por Louis-Charles Malasses. El dispositivo consta de una placa de vidrio con una cuadrícula grabada con láser en la cual es posible realizar el recuento de células o partículas en un volumen específico de un fluido. [Strober W (2001). ["Monitoring cell growth". In Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Sherach EM, Strober W. Current Protocols immunology. 5. USA: John Wiley & Sons. p. A.2A.1.]



Esquema de la cuadrícula de la cámara de Neubauer.

Para facilitar el recuento de células viables se utiliza un colorante vital, el azul tripano. Las células vivas captarán el colorante, pero lo expelerán al medio, mientras que las células muertas lo mantendrán en su interior. Generalmente se preparan diluciones 1:4 o 1:8 de la suspensión celular a contabilizar. El resultado se obtiene multiplicando el número de células contadas en la cámara de Neubauer por el valor de la dilución realizada (4 u 8) por el valor del factor de la cámara (1×10^4).

Material

- Tubos eppendorf de 0.2 mL.
- Cultivos de células Huh-7.

Reactivos

- Medio de cultivo Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Colorante azul tripano. 100 mL. Marca GIBCO. Cat. 15250-061.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio.
- Incubadora con tanque de CO₂.

Protocolo

1. Procesar las botellas de cultivo hasta la resuspensión y disgregación en medio nuevo de las células. Procurar una disgregación completa, sin que el medio presente cúmulos del cultivo flotando o suspendidos.
2. Tomar una alícuota de 60 μL de medio de cultivo nuevo y depositarla en un tubo cónico de 200 μL .
3. Medir una alícuota de 10 μL de la suspensión celular y depositarla en el tubo cónico del 200 μL . Procurar homogenizar completamente antes de realizar la medición, puesto que de forma natural las células precipitan volviendo a formar el botón al fondo del tubo donde se centrifugaron.
4. Medir 10 μL del colorante azul tripano y colocarla en el tubo cónico de 200 μL .
5. Mezclar con ayuda de una puntilla de 200 μL el volumen del tubo, subiendo y bajando su contenido sin formar burbujas.
6. Depositar 10 μL de la suspensión celular con colorante en la cámara de Neubauer.
7. Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, contar el número de células vivas en las cuatro cuadrículas de 4 x 4 de la cámara. Registrar los números.
8. Contar el número de células en el cuadrante central de 5 x 5. Registrar la cantidad.
9. Realizar el cálculo del total de células empleando la siguiente fórmula:
$$\text{No. células/mL} = (\text{Promedio } 4 \times 4) (\text{Factor de dilución}) (1 \times 10^4)$$
10. El número obtenido con el promedio de las cuadrículas de 4 x 4 debe ser similar al cálculo realizado con el total de células en la cuadrícula central de 5 x 5.
11. Multiplicar el número de células/mL por el volumen en el cual se resuspendieron y disgregaron las células del cultivo para obtener la cantidad total de células producidas.
12. Con respecto al total de células contabilizadas y el volumen total, colocar el volumen correspondiente al número de células deseado en la botella o placa de cultivo.

10.4. CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Fundamento

Cuando una línea celular se expande en números suficientes, la congelación de células permite la generación de bancos que pueden almacenarse sin que el material envejezca. De esta forma las células también estarán protegidas de contaminación, fallas en la incubadora o agotamiento del medio de cultivo. Se recomienda congelar $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células/mL en suero bovino fetal suplementado con un agente conservador (glicerol o DMSO) a una concentración del 5-10%, para proteger a las membranas del daño causado por los cristales de agua. La congelación debe ser lenta y se recomienda que el almacenamiento final se realice en un tanque de nitrógeno líquido, donde las células pueden permanecer viables durante varios años.

Material

- Cultivos celulares semiconfluentes.
- Micropipetas.
- Crioviales de 2 mL. Marca Corning. Cat. 430659.
- Tubos Falcón de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.

Reactivos

- Suero bovino fetal. 500 mL:
 - a) Para C6/36: Marca Hyclone.
 - b) Para Huh-7: Marca GIBCO.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grado Biología molecular. 100 mL. Marca Sigma. Cat. D2650.

- Hielo.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de presión y vacío.
- Centrífuga.
- Hielera.
- Refrigerador de -20 – 0 °C.
- Ultracongelador Revco.

1. Protocolo para células C6/36.

- a. Cuando se observa un cultivo confluyente de células C6/36 en una botella de 25 cm², permitir que crezcan un día más.
- b. Raspar las células de la botella con ayuda de un gendarme (cellscraper).
- c. Colectar medio en tubo Falcón y centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos. Si las células no han formado un pellet, centrifugar de nuevo.
- d. Decantar medio de cultivo y resuspender en 2 mL de suero bovino fetal completo.
- e. Depositar en el criovial 900 µL de la suspensión celular y añadir 10 µL de DMSO.
- f. Enfriar células a 4 °C durante 5 minutos.
- g. Pasar células a -20 °C durante dos horas. No exceder tiempo.
- h. Almacenar células a -70 °C.
- i. Se recomienda hacer pases de la línea celular cada 6 meses.

2. Protocolo para células Huh-7.

- a. Cosechar células Huh-7 siguiendo el protocolo de subcultivo hasta la obtención del botón celular.
- b. Remover completamente el medio utilizado para neutralizar la tripsina, empleando una micropipeta de 1000 μ L y procurando no romper el botón celular.
- c. Resuspender células en suero bovino fetal completo. Añadir tanto suero como sea necesario para obtener una suspensión con una concentración final de 1.5 a 2 millones de células por mL.
- d. Preparar crioviales a congelar. Flamear el cuello y la tapa de cada uno de ellos.
- e. Depositar en cada criovial 100 μ L de DMSO. No flamear después de colocar el disolvente.
- f. Depositar en cada vial 900 μ L de la suspensión de células en suero bovino fetal.
- g. Almacenar células en hielo (4 °C) durante 5 minutos.
- h. Transferir crioviales a refrigerador a -20 °C durante dos horas. No almacenar a esta temperatura por más de 3 horas.
- i. Transferir células a Ultracongelador Revco a -80 °C. Las células congeladas y almacenadas a esta temperatura tienen caducidad de un año.

10.5. DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Fundamento

El proceso de congelación resulta estresante para las células. El uso de una buena técnica de descongelación asegura que una alta proporción de las células congeladas sobrevivan. Es importante evitar manipulaciones bruscas de

los volúmenes de las alícuotas congeladas, ya que las membranas celulares se encuentran altamente sensibilizadas.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm².
 - a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
 - b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.

Reactivos

- Medio de cultivo
 - a) Para C6/36: L-15 suplementado al 5% con suero bovino fetal.
 - b) Para Huh-7: Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Microscopio.
- Incubadora.

Protocolo

1. Permitir atemperar el medio de cultivo a utilizar para sembrar las células al menos 40 minutos antes de la realización de la técnica. Después de sacar el medio del baño maría se debe limpiar con etanol al 70% antes de permitir su entrada a la campana de bioseguridad.
2. Depositar 5 mL de medio de cultivo atemperado en una botella de 25 cm².
3. Introducir criovial en baño de agua a 37°C hasta observar la descongelación de su contenido.
4. Depositar suavemente la alícuota completa del criovial y homogenizar el contenido de la botella con movimientos circulares suaves.
5. Revisar al microscopio las células recién depositadas en la botella de cultivo.
6. Incubar botella de cultivo bajo las condiciones requeridas dependiendo del tipo de línea celular que se trate.

10.6. INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON DENGUE

10.6.1. CULTIVO VIRAL: AMPLIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE EN LÍNEAS CELULARES.

Fundamento

El cultivo viral del dengue es el estándar de oro para la confirmación y aislamiento de casos positivos. Empleando líneas celulares permisibles como C6/36, TRA-284-SF, AP-61 o Vero se pueden obtener grandes cantidades de partículas virales viables a partir de aislados de pacientes o macerados de mosquitos. El proceso involucra la obtención del cultivo celular semiconfluyente, la adición del suero infeccioso y la adsorción de las partículas virales en la membrana celular. Se permite que el virus se replique de 7 a 14 días dependiendo del serotipo presente para su posterior cosecha o análisis por inmunofluorescencia. Los virus del dengue suelen ser citopáticos. El protocolo

descrito en este anexo se adaptó empleando la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus* y la cepa viral H- 17247 de DENV-2.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11C.
- Cultivos confluentes de células C6/36 en botellas sin filtro de 25 cm².
- Virus prototipo Dengue 1 cepa H-159911 conservado a -80°C.
- Virus prototipo Dengue 2 cepa H-17247 conservado a -80°C.

Reactivos

- Medio L-15 suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Pipetor.

Protocolo

1. Sembrar células C6/36 hasta obtener una monocapa confluyente bajo las condiciones indicadas en el protocolo correspondiente.
2. Desechar medio de cultivo por decantación.
3. Lavar células con 3 mL de solución PBS 1X para remover el detrito celular. Realizar movimientos circulares para limpiar la monocapa completa.
4. remover PBS 1X.

5. Recambiar medio por L-15 al 2% SBF, en un volumen adecuado para cubrir solamente las células (25 cm²: 2 mL, 75 cm²: 3.5 mL, tubo Nunc: 1 mL).
6. Adicionar al medio 100 – 150 µL del aislado viral.
7. Homogenizar botella con movimientos circulares para asegurar que el virus tenga contacto con la monocapa celular completa.
8. Incubar a 37°C durante una hora al menos.
9. Transcurrida la hora de incubación, completar volumen del medio de cultivo a los indicados en el apartado de subcultivo celular.
10. Incubar a temperatura ambiente sin fuente de CO₂.

Observaciones

- El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% SBF para permitir el mantenimiento celular, pero evitar su división, permitiendo que el virus las infecte sin que mueran.
- Para cada serotipo viral utilizar una alícuota de medio distinta.
- Normalmente una botella de 25 cm² se infecta con 30 – 35 µL del aislado viral, pero la infección con 100 µL permite una producción mayor de partículas virales.
- Si durante el periodo de incubación el medio se torna ácido, añadir unas gotas de solución al 7.5% de bicarbonato de sodio para dejar el medio ligeramente alcalino.
- Si la infección se hace en tubos (Nunc, Nunclon surface), cultivar células a confluencia depositando 2.5 mL de la suspensión 1:10 de células proveniente de botella de 75 cm² (medio 10% SBF). Antes de realizar la infección hacer el recambio al medio correspondiente. Si las células se encuentran muy crecidas, vortexear tubo para poder eliminar las células excedentes al momento de decantar el medio y dejar una monocapa en el tubo. Primero colocar 1 mL de medio al 2% SBF, infectar

con 17 μ L del aislado viral e incubar 37°C. Transcurrido el tiempo, completar volumen de medio a 2.5 mL.

- DENV prefiere un pH alcalino en el medio para infectar a las células

C6/36.

10.6.2. COSECHA Y ALMACENAMIENTO DE AISLADOS VIRALES.

Fundamento

Los virus en cultivo se pueden cosechar para establecer bancos con prototipos virales o para confirmar casos de pacientes enfermos por inmunofluorescencia o técnicas moleculares. Dependiendo del serotipo infectante, el tiempo de cultivo varía. Generalmente dengue 1 y 2 son de crecimiento rápido y la mayoría son líticos, mientras que dengue 3 y 4 requieren más tiempo y no ocasionan cambios morfológicos tan notorios en la monocapa celular. La suspensión células/virus se debe tratar con una mezcla de suero bovino fetal y bicarbonato de sodio para después almacenarse en un ultracongelador. Se puede realizar una purificación mayor del aislado por centrifugación diferencial.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11C.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Tubos Falcón de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL estériles.

Reactivos

- Suero Bovino Fetal. 500 mL. HyClone. Cat. sh30396.03.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Pipetor.
- Hielera.
- Ultracongelador Revco.

Protocolo

1. Transcurridos de 12 a 15 días de la infección celular, se puede cosechar el virus.
2. Si el cultivo se hizo en tubo, vortexear para desprender las células. Si el cultivo se realizó en frascos, raspar con gendarme. No hacer lavados con PBS.
3. Recolectar medio de cultivo y centrifugar para empaquetar las células.
4. Del sobrenadante coleccionar alícuotas y si es necesario, reinfectar un cultivo nuevo con 100 µL de ellos (botella de 25 cm²).
5. Preparar la mezcla de congelación 90% suero bovino fetal: 10% bicarbonato de sodio al 7.5% en un tubo Falcón de 15 mL.
6. Para congelar las alícuotas del virus, de los 6-8 mL que resultan de una botella de 25 cm², añadir 1.5 de mezcla SBF-Bicarbonato y dividir en viales de 1 mL.
7. Almacenar a -70°C.

Observaciones

- La mezcla suero bovino fetal - bicarbonato se usa para proteger las partículas virales. El pH básico les proporciona estabilidad.

10.6.3. PROTOCOLOS PARA MANEJO DE ARN

a. Extracción de ARN.

Fundamento

TRIzol (Invitrogen), es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que se emplea para la extracción de ARN basada en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi. [Anal. Biochem. 162 :156-9, 1987.] Durante la homogenización de la muestra, el reactivo mantiene la integridad del RNA mientras lisa las células y disuelve componentes celulares. La adición de cloroformo y la posterior centrifugación, separa la mezcla en dos fases (acuosa y orgánica). El ARN se precipita añadiendo isopropanol a la fase acuosa y se recupera por centrifugación.

Material

- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Microtubos de 2 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.
- Pipetas automáticas.

Reactivos

- TRIzol.
- Cloroformo. 500 mL. Sigma-Aldrich. Cat. 2432-500mL.
- Isopropanol.
- Etanol al 70% en agua DEPC.
- Agua DEPC.

Equipo

- Centrífuga refrigerada.
- Campana de flujo laminar.

Protocolo

1. Remover medio por aspiración de la botella o los pozos de la placa de cultivo. No hacer lavado con PBS.
2. Fase de homogenización: Adicionar 1 mL de TRIzol a una botella de 25 cm² para su lisis. En el caso de hacer la extracción de RNA a un extracto viral, usar una proporción 1:1 volumen, La adición del TRIzol debe hacerse a 4°C.

3. Fase de separación: Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
4. Transferir la mezcla de TRIzol a un tubo eppendorf de 2 mL.
5. Añadir 40 µL de cloroformo frío por cada 200 µL de TRIzol empleados. Mezclar por inversión 15 segundos.
6. Incubar el tubo en hielo de 2 a 3 minutos.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
8. Fase de precipitación: Recuperar la fase acuosa y adicionarle 500 µL de isopropanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado.
9. Incubar a -80°C durante una hora o toda la noche.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
11. Fase de lavado: Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de etanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado. Mezclar con vórtex.
12. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
13. Fase de resuspensión: Retirar etanol sin tocar la pastilla con la puntilla.
14. Dar un pequeño spin a temperatura ambiente para poder eliminar los restos de etanol en el tubo con ayuda de una puntilla de 10 µL.
15. Resuspender la pastilla en 20-30 µL de agua DEPC con 1 µL de inhibidor de ARNasas (RNAout o RNAsin).

b. Síntesis de cADN (retrotranscripción).

Fundamento

En la reacción de retrotranscripción, se sintetiza cADN (ADN complementario) a partir del RNA por acción de la enzima retrotranscriptasa reversa. En este protocolo la enzima empleada es la MMLV (Molones Murine Leucemia Virus), obtenida de forma recombinante y purificada a partir de *E. coli*. Posee actividad 5'-3' ribonucleasa H, la cual permite alongar las cadenas de cADN hasta una longitud mayor a 7 Kb.

Material

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

Reactivos

- Buffer RT 5X
- Random primers 0.02 mg/mL
- DTT 0.01 M
- dNTPs 10 mM
- Inhibidor de ARNasas 40 U/mL
- Agua mili Q tratada con DEPC

Equipo

- Pipetas automáticas.
- Termociclador. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.

Protocolo

1. Colocar en un tubo eppendorf de 0.2 mL 1 μ L de random primers, 3 μ L de RNA y 7.5 μ L de agua DEPC.
2. Colocar los tubos en el termociclador a 72 °C durante 10 minutos.
3. Incubar la muestra en hielo durante 3 minutos.
4. Preparar la siguiente mezcla de reacción: 4 μ L de buffer RT 5X, 2 μ L de DTT 0.1 M, 0.5 μ L de inhibidor de ARNasas y 1 μ L de dNTPs 10 mM.
5. Añadir 8 μ L de la mezcla de reacción al tubo que se incubó en hielo, así como 1 μ L de la enzima MMLV.
6. Colocar el tubo en el termociclador y continuar con el siguiente programa:
 - a) 10 minutos/ 25 °C.
 - b) 60 minutos/ 37 °C.
 - c) 5 minutos/ 94 °C.
 - d) 10 minutos/ 4 °C.
7. Terminando el programa del termociclador, retirar el tubo que contiene el cADN y almacenarlo a -20°C hasta su uso.

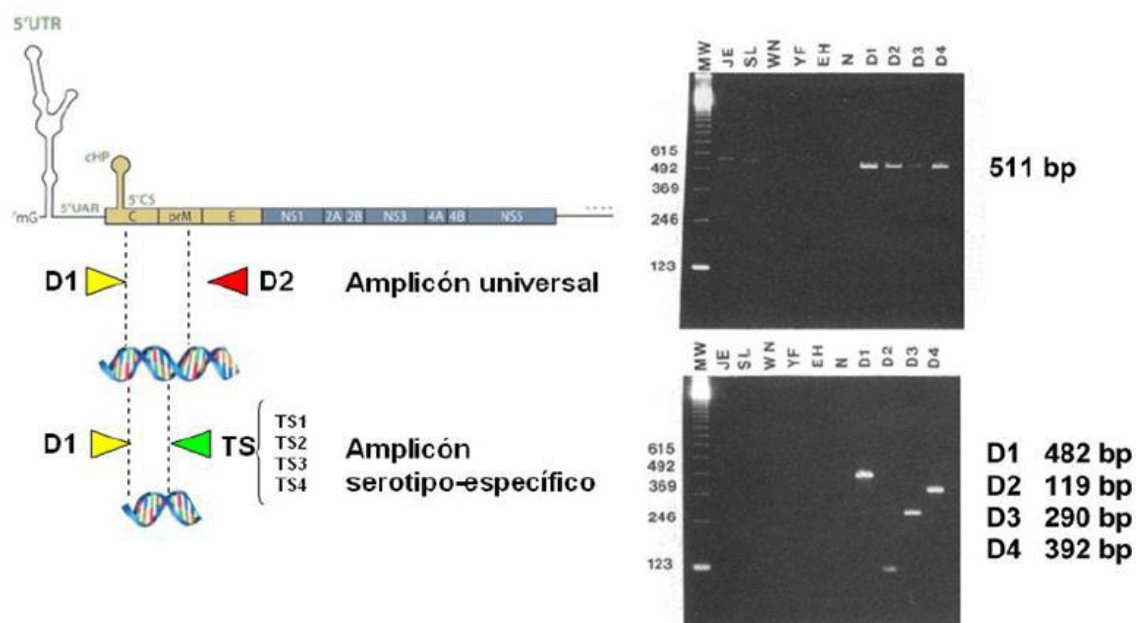
Condiciones de reacción		Programa del termociclador		
Reactivo	Volumen	Paso	Temperatura	Tiempo
Buffer RT 5X	4 µL	1	72 °C	10 minutos
DTT 0.1 M	2 µL	2	25 °C	10 minutos
RNAse out	0.5 µL	3	37 °C	60 minutos
dNTPs 10 mM	1 µL	4	94 °C	5 minutos
RT-MMLV 200U/mL	1 µL	5	4 °C	10 minutos
Volumen total	8.5 µL			

10.6.4. DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL DENGUE

a. Serotipificación del virus del dengue por el protocolo de Lanciotti.

Fundamento

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por dengue incluye técnicas moleculares como la RT-PCR, para la cual se han reportado y publicado más de 16 protocolos diferentes. Sin embargo, el protocolo cuyo uso se encuentra más extendido a nivel mundial es el reportado por Lanciotti y colaboradores en 1992. El protocolo involucra un par de primers universales para los cuatro serotipos del dengue (primers D1 y D2), que hibridan sobre la región C y pre-M del genoma viral. Posteriormente en una segunda ronda de amplificación, utilizando primers específicos para cada serotipo ('Type Specific primers', TS: TS1, TS2, TS3 y TS4) se amplifica un fragmento con un tamaño particular para cada serotipo viral. [J. Virol. Meth. 72:27-41].



Esquema de amplificación para la serotipificación del DENV.

Se ha reportado que este ensayo excede la sensibilidad obtenida por amplificación viral en cultivo celular cuando se usan alícuotas de la misma muestra, y se usa ampliamente para diagnóstico y monitoreo del dengue, particularmente en países del sureste de Asia. [J. Clin. Microbiol., August 2003, p. 3864-3867, Vol. 41, No. 8].

Material

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

Reactivos

- Taq DNA Polymerase recombinante.
- Buffer 10X para PCR sin Mg²⁺
- Cloruro de magnesio 50 mM.
- Primers D1, D2, TS1 y TS2.
- dNTPs.
- Agua miliQ
- Agarosa Ultrapura. Marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Equipo

- Termociclador. Marca Eppendorf. Modelo Mastercycler gradient.
- Cámara de electroforesis. Marca Owl. Modelo B1A.
- Fuente de poder. Marca Bio Rad. Modelo Power Pac 100.
- Horno de microondas. Marca Panasonic.

Protocolo

Condiciones de reacción:

PCR D1-D2		PCR D1-TS	
Reactivo y concentración	Volumen (µL)	Reactivo y concentración	Volumen (µL)
Agua Mili Q	13.8 µL	Agua Mili Q	12.2 µL
Buffer PCR 10X	2 µL	Buffer PCR 10X	2.5 µL
MgCl ₂ 50 mM	1.5 µL	MgCl ₂ 50 mM	1.5 µL
dNTPs 10 mM	0.5 µL	dNTPs 10 mM	0.5 µL
Primer D1 10 µM	0.7 µL	Primer D1 10 µM	1 µL
Primer TS1 10µM	0.7 µL	Primer TS1 10 µM	0.5 µL
Taq polimerasa	0.3 µL	Primer TS2 10 µM	0.5 µL
cDNA	5 µL	Primer TS3 10 µM	0.5 µL
Volumen total	25 µL	Primer TS4 10 µM	0.5 µL
		Taq polimerasa	0.3 µL
		cDNA	5 µL
		Volumen total	20 µL

Programa para la amplificación de DENV1 y DENV2.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5 minutos
2	94 °C	1 minuto
3	60 °C	40 segundos
4	72 °C	40 segundos
5	Ir al paso 2, 40 veces	
6	72 °C	10 minutos
7	4°C	Esperar

10.6.5. RESUSPENSIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Jatropha dioica* PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Para los experimentos de citotoxicidad y actividad antiviral, 2 mg de extracto hidroalcohólico de *J. dioica* se disolvieron con dos mL de medio de cultivo advanced-DMEM, al 1% de DMSO para obtener una concentración de 1,000 µg/mL. Las diferentes concentraciones utilizadas fueron preparadas a partir de esta solución.

10.6.5.1. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACION CITOTÓXICA.

Se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad, se sembraron para la línea celular C6/36 30,000 de células, para células Vero 10,000 células y para la línea celular Huh-7 10,000 células por pozo en una placa de 96 pozos, se incubaron por 24 h para permitir su adherencia, después de este tiempo, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con medio fresco con diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico, diferenciales o compuesto aislado (125, 250, 500 y 1,000 µg/mL) y se incubaron nuevamente por 48 h. Este experimento se llevó a cabo por triplicado para cada extracto. Se utilizó como control negativo células sin exponer al extracto hidroalcohólico.

Después de tres días de incubación, la viabilidad celular se determinó mediante la adición de 200 µL por pozo de una solución de 10% de Azul Alamar, se incubaron 4 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 570 nm y a 600 nm. Posteriormente se graficaron curvas de dosis respuesta de las diferentes concentraciones utilizadas. La CC₅₀ se determinó como la concentración de extracto, necesario para reducir la viabilidad celular en un 50%, tomando como 100% de viabilidad celular el control negativo.

10.6.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDENGUE.

La actividad antiviral del extracto hidroalcohólico se determinó utilizando el ensayo qPCR, a partir de un formato en placa de 6 pozos y se incubaron las células C6/36 y Vero con 10 µL del DENV-2 durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, el sobrenadante se desechó y se agregó medio fresco según la línea celular, con DMSO al 1% y 1.6% de Carboximetilcelulosa. Se añadió el extracto hidroalcohólico a las placas ha concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL y se incubaron por 48 horas. Se utilizaron para los ensayos controles de crecimiento celular, control negativo y células infectadas y sin extracto como control positivo de infección. Después se procedió a realizar la extracción de ARN como se describe anteriormente. Una vez obtenida los ARN, se procedió a realizar la PCR en tiempo real por medio de la enzima SuperScript III RT/Platinum One—step qRT-PCR bajo las siguientes condiciones:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Incubación Final
Repetición	1	1	45	
Temperatura (°C)	50	95	95	60
Tiempo	30 minutos	10 minutos	15 segundos	1 minuto

Condiciones de reacción para la RT-qPCR.

Para ello se prepara la mezcla de trabajo detallada en la siguiente tabla.

Reactivo	1 rx.(µL)
Agua grado PCR	6.57
<i>SuperScriptTM III RT/Platinum® Master Mix 2x</i>	12.5
Iniciador Sentido para Dengue 2 a 100 µM	0.125
Iniciador Antisentido para Dengue 2 a 100 µM	0.125
Sondas para Dengue Serotipo 1,2,3 y 4 a 100 µM	0.045
<i>SuperScriptTM III RT/Platinum® Taq Mix</i>	0.5
Muestra	5
Total	25

Reactivos para mezcla de RT-qPCR con Enzima *SuperScriptTM III*

10.6.7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRUS DE HEPATITIS C.

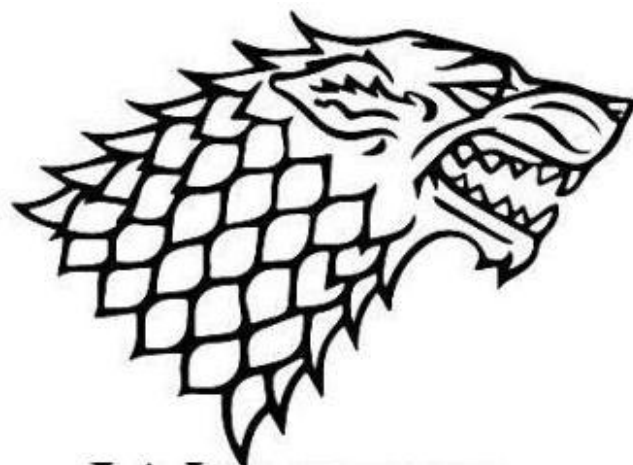
La actividad antiviral del extracto hidroalcohólico se determinó utilizando el ensayo qPCR, a partir de un formato en placa de 6 pozos y se incubaron las células Huh7 replicón y se incubarán por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, el sobrenadante se desechó y se agregó medio fresco ADMEM 1% SBF. Se añadió el extracto hidroalcohólico a las placas a concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL y se incubaron por 48 y 72 horas. Se utilizaron para los ensayos controles de crecimiento celular, se utilizó células Huh7 parentales como control negativo y células Huh7 replicón (Mock) y sin extracto hidroalcohólico control positivo de infección.

Para la PCR cuantitativa se utilizó un ensayo que contiene la sonda TaqMan específica para VHC. Así mismo, se utilizó el reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Los volúmenes de reacción fueron los siguientes:

Reactivos	1 rx(µL)
Buffer Universal Master Mix	10
sonda Taqman VHC	1
H ₂ O	4
cADN	4
Total	20

Reactivos para mezcla de qPCR para VHC

Para normalizar los resultados de expresión se utilizó el ensayo de β-Actina 20X también de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Cada condición se realizó por triplicado. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR System de Applied Biosystems.



WINTER
IS
COMING

